UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ

MUDr.David Belada

STANOVENÍ TRANSKRIPTU BCL-2/IgH U NEMOCNÝCH S FOLIKULÁRNÍM B-NEHODGKINSKÝM LYMFOMEM LÉČENÝCH CHEMOTERAPIÍ EVENT.V KOMBINACI S MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKOU ANTI CD 20 - RITUXIMABEM

Doktorský studijní program: vnitřní nemoci

Hradec Králové, 2008

Práce byla částečně podpořena výzkumným záměrem **MZO 00179906** a grantem **IGA NR/9453-3**
Ministerstva zdravotnictví České republiky

Tato disertační práce v oboru vnitřní lékařství byla vypracována na II.interní klinice, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, a to v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu vnitřní nemoci na Universitě Karlově v Praze, Lékařské fakultě v Hradci Králové.

Uchazeč: MUDr.David Belada

II.interní klinika, oddělení klinické hematologie

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: Prof.MUDr.Jaroslav Malý, CSc.

II.interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Universita Karlova v Praze, Lékařská Fakulta v Hradci Králové

OBSAH:

1.Obsah

2.Literární přehled

2.1. Folikulární lymfom – základní morfologická a klinická charakteristika.....5

2.2. Charakteristika genu Bcl-2.....6

2.3. Charakteristika translokace t(14;18).....7

2.4. Varianty translokace zahrnující gen Bcl-2.....10

2.5. Výskyt t(14;18) a její úloha při vzniku lymfomů.....11

2.6. Senzitivita t(14;18) při sledování aktivity folikulárního lymfomu.....15

2.7. Je t(14;18) charakteristická pro všechny folikulární lymfomy?.....16

2.8. Existují t(14;18) negativní folikulární lymfomy? 17

2.9. Jaký je klinický význam translokace t(14;18)? 19

2.10. Technické aspekty detekce translokace t(14;18).....19

2.11. Jaký je optimální kompartment pro sledování t(14;18)?.....24

2.12. Význam molekulární remise po léčbě.....26

2.12.1. Význam molekulární remise po standardní terapii.....26

2.12.2. Molekulární remise a autologní transplantace.....28

2.12.3. Molekulární remise a purging.....30

2.12.4. Molekulární remise a alogenní transplantace.....31

2.12.5. Molekulární remise a rituximab.....32

3.Experimentální část

3.1. Cíl práce.....35

3.2. Metodika.....35

3.3. Soubor nemocných.....36

3.4. Léčba.....38

3.5. DNA extrakce a analýza.....40

4. Statistická analýza.....40

5.Výsledky.....42

5.1. Stanovení Bcl-2/IgH a jejího typu.....42

5.2. Význam vstupní Bcl-2/IgH pozitivity na výsledky léčby a prognózu.....44

5.3. Klinická a molekulární odpověď po indukční léčbě chemoterapií a imunochemoterapií.....49

5.4. Klinická a molekulární odpověď na sekvenční podání rituximabu po Chemoterapii.....52
5.5. Klinická a molekulární odpověď po celé léčbě 53
5.6. Význam dosažení Bcl-2/IgH negativity na prognózu onemocnění.....57
5.7. Záchyt Bcl-2/IgH v jednotlivých kompartmentech před léčbou a po léčbě...62
5.8. PCR analýza Bcl-2/IgH v periferní krvi a kostní dřeni - porovnání s výsledky imunohistochemického průkazu bcl-2 proteinu ve vzorcích kostní dřeně....62
6. Diskuse.....63
7. Přílohy
7.1. Přehled použité literatury.....68
7.2. Seznam použitých zkratek.....86
8. Poděkování.....88

2. Literární přehled

2.1 Folikulární lymfom – základní morfologická a klinická charakteristika

Folikulární lymfom (FL) je druhý nejčastější ne - Hodgkinův lymfom (NHL) v západní populaci (1,2). V Evropě tvoří asi 20-25 % nehodgkinových lymfomů u dospělé populace (1, 3). Na druhou stranu onemocnění je podstatně vzácnější v oblasti Asie, Afriky a rozvojových zemí (4). Jedná se o maligní klonální zvrat periferních B lymfocytů ve folikulárním centru mízní uzliny (4). Onemocnění se častěji vyskytuje u pacientů staršího věku, medián věku v době prezentace je kolem 60 let (5). FL je charakteristický svými morfologickými znaky – přítomností nádorové populace centrocytů a centroblastů, typickými imunofenotypizačními markery (CD19, CD20, CD 79a a v 60 % i CD10 pozitivita) a molekulárně genetickými znaky – přítomností translokace t(14;18) (q32;q21). Histologicky rozlišujeme u folikulárních lymfomů grade 1-3, a to dle procentuálního zastoupení centroblastů. Zatímco FL grade 1, 2 a 3a patří svým klinickým průběhem mezi indolentní lymfomy, FL grade 3b je řazen již mezi agresivní NHL a svým klinickým průběhem se blíží nejčastějšímu nehodgkinovému lymfomu – difúznímu B-velkobuněčnému NHL. Obecnou vlastností FL grade 1 a 2 je indolentní průběh, relativně vysoký počet odpovědí na úvodní léčbu (zejména při kombinaci chemoterapie a monoklonální protilátky anti CD20 – rituximabu), ale také velké riziko relapsu onemocnění, event.transformace do NHL vyššího stupně malignity. Transformace je spojena s cytogenetickými změnami, mutací tumor-supresorového genu p53 na 17.chromozómu nebo delecí chromozómu 9p21 (6, 7). Onemocnění je často diagnostikováno až v pokročilém stadiu, s postižením kostní dřeně (u více než 50 % pacientů). U většiny nemocných lze dosáhnout léčbou 1. linie klinické remise, jejíž délka trvání se pohybuje mezi 12-36 měsíci (8). Většina nemocných ale relabuje (2, 9, 10, 11). S počtem relapsů klesá pravděpodobnost dosažení následné klinické remise a zkracuje se i délka trvání remise – období bez známek nemoci se pohybuje kolem 25 % v 5 letech a jen 10 % v deseti letech. U pokročilých stádií je zatím toto onemocnění považováno v současné době za nevyléčitelné. Jen malá skupina nemocných, u kterých bylo onemocnění diagnostikováno již v lokalizovaném stadiu (těch je ale jen asi 5-10 %), má šanci na dlouhodobé vyléčení, a to za pomocí lokalizované radioterapie (12). Přirozený průběh onemocnění je velmi variabilní, popisovány jsou i spontánní regrese choroby, někteří asymptomatičtí nemocní nevyžadují v době diagnózy léčbu a je u nich uplatňována strategie „watch and wait“, protože nejsou v současné době důkazy, že by časná léčba

asymptomatických nemocných byla přínosná. Na druhou stranu průběh některých onemocnění je relativně velmi agresivní, zejména u nemocných, kde došlo k transformaci FL do agresivnějšího typu NHL – většina nemocných z této skupiny umírá do 2 let (8, 13).

2.2. Charakteristika genu Bcl-2

Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma) je označení genu, který se podílí na patogenezi FL. Produktem exprese tohoto genu je bcl-2 protein, který je vyjádřen na povrchu buněk FL (ale i celé řady jiných lymfomů i jiných nádorů). Existuje mnoho buněk, které transkribují gen Bcl-2 – normální gen kódující bcl-2 protein regulující apoptózu - nejedná se tedy pouze o buňky s charakteristickou t(14;18) u folikulárního lymfomu.

Specifické chromozomální přestavby, zejména translokace a inverze, jsou pozorovány u velké většiny hematologických malignit (14). Jednou z nejčastějších je translokace t(14;18), která je nalézána u celé řady B-lymfoproliferativních onemocnění. Jaká je podstata a funkce proteinu bcl-2 - produktu transkripce Bcl-2 genu? Protein bcl-2 je intracelulární membránový protein, jehož distribuce závisí na buněčném typu. Je nejčastěji lokalizován v mitochondriích (u většiny krevních buněk), v některých buňkách i v hladkém endoplazmatickém retikulu či jaderné membráně (15, 16). Gen Bcl-2 byl poprvé studován u lymfoproliferativních onemocnění v polovině 80.let minulého století (Clearly et al.1986, Tsujimoto a Croce 1986). Tento gen je zapojen již do časné fáze onkogeneze u t(14;18) pozitivních folikulárních lymfomů. Zaujímá více než 230 kb deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a skládá se ze 3 exonů, kde exon 2 a malá část exonu 3 kóduje samotný protein bcl-2. Exony 2 a 3 jsou odděleny intronem o velikosti cca 225 kb (17). Byly identifikovány 3 druhy transkriptů o velikostech 8,5 kb, 5,5 kb resp.3,5 kb. Sekvenční analýzou Bcl-2 DNA bylo zjištěno, že vlastní gen Bcl-2 kóduje 2 různé bílkovinné produkty – bcl-2 alfa a bcl-2 beta, které se liší karboxylovým koncem, kde jen část Bcl-2 alfa je biologicky významná (18). Porovnáním bylo zjištěno, že bcl-2 protein u nemocných s folikulárním lymfomem je identický s normálním bcl-2 proteinem, který je produkován nenádorovými buňkami (18). Bcl-2 je unikátní mezi protoonkogeny, protože není stimulátorem proliferace jako např.c-myc onkogen, nepřispívá k nádorovému růstu při ztrátě své funkce jako gen p53, ale jeho hlavní funkcí je ochrana buňky před programovanou buněčnou smrtí - apoptózou. Činí tak několika různými mechanismy – blokádou apoptózy indukované inhibitory růstových faktorů, kyslíkovými radikály, hypoxií nebo různými cytostatiky – některé studie právě tento mechanismus uvádějí jako příčinu chemorezistence FL na cytostatickou léčbu (19, 20, 21,

22). Patofyziologicky pak inhibicí kaspázových enzymů a ovlivňováním funkce mitochondrií – hlavního výkonného orgánu apoptotické smrti buněk (23, 24, 25). In vivo Bcl-2 inhibuje několik, ale ne všechny formy apoptózy, které se objevují během vývoje B-lymfocytů (26). Ze studií vyplývá, že mechanismů apoptózy je celá řada a některé jsou Bcl-2 dependentní, některé nikoliv (26). Ve své činnosti bcl-2 spolupracuje i s mnoha dalšími geny, jako např.c-myc nebo tumor supresorovým genem p53, který dokáže inhibovat (27). Geny, které úzce spolupracují s genem Bcl-2 byly zařazeny do tzv."rodiny genů Bcl-2" (28). Patří sem například gen BAX, silný promotor apoptózy, který vytváří s genem Bcl-2 dimery. Na základě teorie tzv. „buněčného reostatu" se ukazuje, že pokud ve zmíněném dimeru převládá Bcl-2, jedná se o signál pro přežívání buněk, naopak při dominanci genu BAX je trend proapoptotický (29). Význam genu Bcl-2 pro zvrat v maligní lymfoproliferativní onemocnění byl studován na transgenních myších. U skupiny, kde byl Bcl-2 onkogen zabudován do B-lymfocytů, se vyvinula nejprve folikulární hyperplazie, a u některých poté i nehodgkinův lymfom (30). Zajímavé je, že zvýšená exprese Bcl-2 neprovází pouze lymfoproliferativní onemocnění. Bcl-2 protein je exprimován na mnoha různých tkáních – na krevních buňkách všech linií, na zralých T-lymfocytech, B-lymfocytech, ale i na buňkách kůže, štítné žlázy, epitelu prostaty nebo buněk prsní žlázy (31). Zvýšená exprese byla pozorována například i u některých karcinomů prsu, prostaty, ale i u akutních leukémií (32) – zde byla provázena horší prognózou, a to díky špatné odpovědi na chemoterapii způsobené rezistencí na cytostatika (33, 34).

2.3. Charakteristika translokace t(14;18)

Translokace t(14;18) je charakteristickým znakem folikulárního lymfomu. Patří mezi nejčastěji nalézanou cytogenetickou abnormalitou v rámci lymfoidních malignit. Kromě nemocných s folikulárními lymfomy ji ale můžeme naleznout i u cca 20 % nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem. Translokace t(14;18) byla poprvé popsána u špatně diferencovaného lymfomu z malých lymfocytů (35). U folikulárního lymfomu pak v roce 1982, a to na cytogenetické úrovni, analýzou chromozómů u souboru 19 vyšetřovaných nemocných s folikulárním lymfomem. Pozitivní nález t(14;18) byl u 16 nemocných, tedy u 84 % (36). Z molekulárně genetického pohledu zahrnuje lokus 18q21 pro gen Bcl-2, který je translokován do oblasti lokusu 14q32, který kóduje těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) (37, 28). Během translokačního procesu část chromozómu 18 obsahující kódující úsek genu Bcl-2 je přesunuta do oblasti J_H segmentu (nejčastěji J_H6 nebo J_H4) oblasti IgH na 14.chromozómu

(38, 39). Tento aberantní chromozóm je z cytogenetického hlediska označován jako $14q^+$. Na reciprocně vzniklý $18q^-$ chromozóm je naopak translokována část chromozómu 14 obsahující V_H a D_H genové segmenty, a to do oblasti distálně od bcl-2 genu (40, 41, 42). Samotný gen Bcl-2 je i po translokaci strukturálně stále nezměněn (43). Translokace vzniká pravděpodobně chybou během procesu přestavby genů pro těžký řetězec imunoglobulinu ve stadiu pre-B lymfocytu v době, kdy dochází k přestavbě D a J genových segmentů oblasti IgH (40, 42, 44, 45). Bcl-2 onkogen se tak dostává do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, což vede k jeho nadměrně expresi, a tím k nadměrné syntéze proteinu bcl-2 – mohutného inhibitoru apoptózy (26, 37, 46, 47, 48, 49, 50, 51). Tím je vysvětlena skutečnost, že buňky folikulárního lymfomu jsou „nesmrtelné". Bcl-2 protein je pravděpodobně zodpovědný za vysoké procento buněk, které přetrvávají v G_0 fázi buněčného cyklu (52, 53). Samotný růst lymfomu je v tomto případě více způsoben prodlouženým přežitím lymfomových buněk než samotnou zvýšenou proliferační aktivitou, jak je tomu například u agresivních lymfomů (30). Na druhou stranu mnoho pozorování ukazuje, že samotná zvýšená exprese Bcl-2 genu není dostačující pro maligní zvrat lymfocytů v B-lymfom. Genetické experimenty na transgenních myších ukazují, že u myší, které mají Bcl-2/IgH gen, musí proběhnout ještě další změna (např.v genu c-myc), aby došlo k vývoji v B-lymfom (54). Bcl-2/IgH přestavba je tedy nezbytnou, ale ne dostačující změnou v genezi folikulárního lymfomu (54). Možným přístupem k pochopení procesu nádorové transformace je porovnání genové exprese nádorových buněk s jejich normálními, benigními protějšky – tedy buňkami germinálního centra. V rámci studie amerických autorů z M.D.Anderson Cancer Centre byla studována exprese genů buněk folikulárního lymfomu a porovnávána s normálními buňkami germinálního centra, Bcl-2/IgH pozitivními. Analyzováno bylo 588 různých genů z buněk tonzil pacientů s FL a zdravých jedinců z hyperplastických tonzil. Geny s významně odlišnou expresí byly poté ještě vyšetřeny kvantitativní real-time PCR. Byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese 24 genů (např.genů Bcl-2, BSP1, JUN, IL4R) a naopak snížená exprese 8 genů (například CD40, p55CDC). Jedná se o geny regulující buněčný cyklus, adhezi a mezibuněčné interakce a některé transkripční faktory. Z dalších chromozomálních odchylek jsou studovány i změny genu p53. Tyto výsledky podporují teorii několika následujících změn v genezi folikulárního lymfomu (55). Na úrovni cytogenetické byly prezentovány klinicky významné chromozomální aberace v práci Viardota a spoluautorů (56). Metodou komparativní genomové hybridizace bylo z parafínových bločků zpětně vyšetřeno 124 nemocných s folikulárním lymfomem. V 87 případech byly nalezeny chromozomální odchylky. Mezi nejčastější patřily $7q^+$, $12q^+$, $18q^+$ a $6q^-$. U nemocných s folikulárním

lymfomem grade 2 a 3 podle WHO klasifikace se častěji nacházely komplexní přestavby. Prognosticky nejvýznamnějším prediktivním faktorem se ukázala ztráta genetického materiálu 6q25q27, která byla spojena s významně kratším přežitím (p=0.0001). U všech aberací, které měly klinický význam pro celou skupinu, byl potvrzen jejich význam pro skupinu Bcl-2/IgH pozitivních pacientů (56). Prognostický význam delece 6q25 ukázaly i studie dalších autorů (57).

Některé práce ukazují, že cirkulující t(14;18) pozitivní lymfomové buňky přetrvávají u nemocných více jak 10 let po dosažení kompletní remise po radioterapii lokalizovaného folikulárního lymfomu (58, 59, 60). Na druhou stranu dlouhá životaschopnost nádorových B-lymfocytů vede ke genové nestabilitě a k riziku transformace v agresivní lymfom - nejčastěji difúzní B-velkobuněčný lymfom (DLBCL). Na zvratu v agresivní lymfoproliferativní onemocnění se v některých případech podílejí sekundární změny, zejména v oblasti c-myc onkogenu (61, 62, 54).

Na zvýšené expresi onkogenu Bcl-2 se může podílet i aktivita onkogenu umístěného přímo na chromozómu 18 v těsné blízkosti zlomového místa t(14;18), jak bylo popsáno v práci Tsijumota a kol. (37). Tato hypotéza byla potvrzena i ve studii stanfordských autorů (42).

Zajímavé je, že množství nemocných s folikulárním lymfomem exprimující bcl-2 protein je vyšší než počet nemocných s identifikovatelnou t(14;18) – je to způsobeno jednak tím, že ne u všech nemocných jsme schopni technicky detekovat přestavbu díky alternativním místům zlomů a nelze vyloučit, že na deregulaci genové exprese se podílejí ještě další, dosud nepoznané mechanismy. Podobná diskrepance mezi Bcl-2 expresí a přítomností přestavby byla pozorována i u nemocných s DLBCL a B-chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL). U nemocných s DLBCL byla popsána zvýšená exprese Bcl-2 až v 70 % případů, ale genetická přestavba byla zachycena jen v 20-30 % (63, 64, 65, 66). Ve většině studií je přítomnost t(14;18) u DLBCL považována za negativní prognostický faktor odpovědi na léčbu (67). U B-CLL je tento poměr ještě výraznější – většina nemocných s tímto onemocněním exprimuje bcl-2 protein, ale jen u 5 % zaznamenáváme genetickou přestavbu – t(14;18) (68, 69).

2.4. Varianty translokace zahrnující gen Bcl-2

Translokace t(14;18) není uniformní – bylo popsáno několik typů podle zlomového místa na chromozómu 18, v místě Bcl-2 genu. Základní zlomové body na chromozómu 18 jsou na 2 místech: 150 bp velká oblast lokalizovaná v oblasti 3´ třetího exonu Bcl-2 genu označovaná jako MBR (major breakpoint region) a 500 bp velká oblast vzdálená cca 30 kb distálně na Bcl-2 lokusu označovaná jako mcr - minor cluster region. (41, 18, 42, 70, 71, 44). Původně se předpokládalo, že maximum zlomů na chromozómu 18 probíhá v rámci MBR a mcr oblastí. Jen výjimečně byly popisovány zlomy v oblasti VCR (variant cluster region) v exonu 1 genu Bcl-2. Pomocí moderních diagnostických metod, jakými jsou long distance polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo inverzní PCR a fluorescence in situ hybridizace (FISH) se ukázalo, že v oblastech MBR a mcr probíhá jen zhruba polovina zlomů. Další zlomová místa byla detekována v oblasti mezi těmito úseky, a to nazývaném intermediate cluster region (ICR), která se nachází 16 kb distálně centromericky od MBR lokusu (74,75), event.i v oblasti 5´ exonu 1 Bcl-2 genu (73). Kazuisticky jsou potom popisovány další variantní translokace, a to například v oblasti umístěné 10 kb proximálně od Bcl-2 genu na chromozómu 18 označované jako follicular variant translocation gene – FVT1 (76) nebo translokace t(2;18) a t(18;22), které zahrnují geny pro lehké řetězce imunoglobulinů kappa a lambda (77, 78). Tyto atypické translokace byly pozorovány i u cca 5 % nemocných s B-CLL (79, 80).

Na chromozómu 14 jsou zlomová místa ve většině případů konstantní, a to v oblasti JH genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, tedy oblasti, která podstupuje během vývoje B-lymfocytů několik sekvenčních přestaveb. Tato oblast je místem cytogenetických přestaveb u nemocných s Burkittovým lymfomem (72). Jen zcela výjimečně byla popsána atypická zlomová místa v oblasti Su – tzv.switch region, které vedly ke vzniku chimérického produktu Iu/Bcl-2 (73). Sekvenční analýzou nukleotidů DNA zlomového místa na chromozómu 14 bylo prokázáno, že zlom se nachází ve spojovací J4 oblasti nefunkční alely pro těžký řetězec imunoglobulinu.

Některé práce uvádějí cca 15 % nemocných s FL, u kterých nenalezneme pomocí veškerých dostupných diagnostických metod žádnou z translokací (tzv. „germline" konfigurace). V rámci studie amerických autorů z M.D.Anderson Cancer Centre tito nemocní měli signifikantně horší prognózu než nemocní s přestavbami v oblasti MBR nebo mcr. Tříleté období bez selhání bylo u těchto tří skupin 57 % (germline) vs. 76 % (MBR) vs. 95 % (mcr). Z tohoto pohledu vypadá prognóza skupiny s přestavbou v oblasti mcr jako nejlepší,

nutno vzít ale na zřetel, že počty pacientů v této studii byly poměrně malé, a tak tento nález nutno ověřit ve větších studiích (81).

2.5. Výskyt t(14;18) a její úloha při vzniku lymfomů

Specifické cytogenetické změny hrají důležitou roli v genezi celé řady nádorových onemocnění. Stejně tomu tak je i v oblasti nehodgkinových lymfomů, kde je popsána celá řada charakteristických chromozomálních změn u jednotlivých typů lymfomů. Jejich detekce slouží jednak ke stanovení diagnózy onemocnění a jeho prognózy, v některých případech pak může sloužit k monitorování reziduální nemoci po léčbě. Translokace t(14;18) a její záchyt je poměrně variabilní a závisí jak na vyšetřovaném materiálu, tak i na použité technice. Využití t(14;18) pro sledování aktivity onemocnění je poměrně obtížné, a to jak z hlediska biologických, tak i z hlediska technických aspektů jejího stanovení. Biologické aspekty představují zejména velkou variabilitu přestavby a problémy související s interpretací výsledků. Translokace t(14;18) je nalézána u 60-90 % folikulárních lymfomů (70, 82, 83), ale i u cca 15-20 % nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem (71, 83, 85, 86). U části nemocných s DLBCL nesoucích t(14;18) se může jednat o transformaci z folikulárního lymfomu (63). Translokace ale byla nalezena také u jedinců s reaktivní lymfoidní hyperplazií, ale i u zcela zdravých jedinců (23, 86, 87, 88, 89, 90, 91). Porovnáním vzorků periferní krve pacientů s prokázaným folikulárním lymfomem a zdravých dobrovolníků pomocí kvantitativní real-time PCR (QRT-PCR) ale byla zjištěna u skupiny nemocných s folikulárním lymfomem:

a) statisticky vyšší frekvence záchytu t(14;18) – cca 100-200x (92)
b) vyšší hladina cirkulujících t(14;18) pozitivních buněk
c) vyšší pravděpodobnost dosažení hodnot překračujících statisticky stanovený limit pro zdravé dobrovolníky

Procento záchytu t(14;18) pozitivních buněk pro oblast MBR u obou skupin záviselo na množství vyšetřované DNA – při testování 2ug DNA byla nalezena pozitivita u 76 % pacientů s FL vs.22 % dobrovolníků (p=0.0008, Fischerův přesný test), při testování 10ug DNA byl záchyt pozitivity u zdravých dárců již 40 %. Obdobné výsledky byly nalezeny i pro oblast mcr (87). Některé studie v rámci prevence falešně pozitivního záchytu „benigních" elementů s pozitivitou t(14;18) navrhují vyšetřovat při PCR pouze 1ug DNA, čímž klesá riziko detekce

přestavby u zdravých jedinců na 6,6 % (88). Přítomnost t(14;18) pozitivních buněk nalezených v lymfatických folikulech mízních uzlin s benigní folikulární hyperplazií (93), u zdravých dobrovolníků (94), stejně jako ve vzorcích autoptických slezin pacientů, kteří zemřeli na jiné, nemaligní onemocnění (95), podporuje hypotézu, že záchyt t(14;18) pozitivních buněk není záležitostí jen nemocných s folikulárními lymfomy. V jedné ze studií německých autorů (88) byl zaznamenán výskyt t(14;18) pozitivních buněk pomocí nested PCR u 6,6 % zdravých dobrovolníků (při vyšetřovaném množství 2 ug DNA). Po navýšení množství DNA na 10 ug vzrostl záchyt pozitivity až na 45 %. Největší studií zkoumající výskyt t(14;18) u zdravých jedinců byla studie Summerse a kol., během které bylo vyšetřeno 481 zdravých dobrovolníků pomocí real-time PCR na přítomnost t(14;18) s pozitivním záchytem u 23 % (97). Jednou z nejnovějších prací v této oblasti je studie německých autorů, která zkoumala stejnou přestavbu u vzorku 204 zdravých jedinců pomocí 2 nezávislých PCR metod – nested PCR a real-time PCR. Pozitivita t(14;18) byla zjištěna u 39/204 (24 %) vyšetřovaných, což odpovídá výsledkům zveřejněným ostatními autory (90, 97). V práci nebyla zjištěna korelace mezi frekvencí výskytu a věkem či pohlavím (98). Jednou z mála prací, která prokázala významně vyšší zastoupení t(14;18) mezi zdravými lidmi, byla práce Dölkena a kol., kdy byla popsána t(14;18) u 55 % zdravých jedinců v souboru 131 vyšetřovaných. Vysvětlením může být skutečnost, že většinu souboru tvořili muži, u kterých i některé jiné studie prokazují vyšší prevalenci t(14;18) (99). Při porovnání s vyšetřovanými vzorky jedinců s folikulárním lymfomem v kompletní remisi po radioterapii pro lokalizované stadium folikulárního lymfomu byl ale v této skupině statisticky vyšší záchyt cirkulujících t(14;18) pozitivních buněk. Jako hranice pro dostačující záchyt t(14;18) pozitivních buněk u zdravých jedinců bylo stanoveno 2,5 ug DNA, což reprezentuje cca 250 000 mononukleárních buněk (88). Důležitým zjištěním je skutečnost, že t(14;18) pozitivní buňky pacientů s lymfomy nejsou odlišitelné od stejných elementů zdravých dobrovolníků (38, 100). V dalších studiích byl prokázán narůstající výskyt t(14;18) buněk s rostoucím věkem vyšetřovaných pacientů. Mezi skupinami nemocných do 20 let a nemocnými nad 60 let byl zaznamenán třináctinásobný rozdíl ve výskytu t(14;18) buněk ve prospěch starší populace. Tento rozdíl může být i na vrub postupné akumulace dlouho žijících t(14;18) pozitivních buněk. Tomuto nálezu odpovídá i vyšší výskyt folikulárního lymfomu ve vyšších věkových kategoriích (95, 101). Záchyt t(14;18) pozitivních buněk u zdravých dobrovolníků je vysoký – cca 50 % nese buňky s přestavbou v oblasti MBR Bcl-2 genu. Rozdíl oproti jedincům s folikulárními lymfomy (kde je odhadovaný záchyt přestavby v MBR oblasti také cca 40-50 %) je v kvantitě pozitivních buněk. U zdravých jedinců je množství t(14;18) pozitivních

buněk pouze cca $1:10^{5-6}$, což je řádově méně než u jedinců s FL, kde je výskyt 100-200x vyšší (88). Na základě těchto výsledků lze říci, že „pre – pre – lymfomové" buňky nesoucí t(14;18) vznikají stochasticky i u zdravých jedinců a díky vysoce citlivým metodám (PCR) je možnost jejich detekce. Jelikož tyto elementy jsou díky exprimovanému bcl-2 proteinu „nesmrtelné", tímto je vysvětlován vyšší záchyt u starších jedinců, neboť dochází ke kumulaci těchto elementů v organismu. Pokud dojde k další molekulárně genetické změně, mohou se tyto buňky transformovat v nádorové, lymfomové buňky folikulárního lymfomu. Po léčbě může dojít k eliminaci těchto lymfomových buněk, ale původní „pre – pre – lymfomové" buňky mohou přetrvávat po zbytek pacientova života. Tato skutečnost může vysvětlit přetrvávající PCR pozitivitu u jedinců v dlouhodobé remisi po úspěšné terapii folikulárního lymfomu. Zdali tyto reziduální elementy jsou skutečně benigními elementy nebo reziduální populací lymfomových buněk, v současné době nelze rozlišit (58, 59, 60). Do budoucna bude nutné najít další molekulárně genetické, specifické změny, které tyto dvě skupiny dokážou odlišit.

V literatuře je popsán i případ nemocného s folikulárním lymfomem po alogenní transplantaci od HLA identického dárce, kde byly detekovány 2 různé klony t(14;18) pozitivních buněk – po alogenní transplantaci došlo k vymizení pacientových t(14;18) pozitivních buněk a byl zachycen klon dárcovských t(14;18) pozitivních buněk benigního původu. Z tohoto důvodu je vhodné pro event. sledování minimální reziduální nemocni u nemocných po alogenní transplantaci vyšetřit jak nemocného, tak i dárce na přítomnost t(14;18) pozitivních buněk, aby bylo možno oba klony rozlišit. Tím je i možné eliminovat riziko „zbytečné" léčby molekulárně genetického relapsu po transplantaci. Podobnou koexistenci 2 klonů, „maligního" a „benigního" popsali i další autoři (102). Současně bylo potvrzeno, že t(14;18) pozitivní dárci nejsou vyloučeni z důvodu této pozitivity z možnosti darovat kmenové buňky pro alogenní transplantaci – benigní klon t(14;18) pozitivních buněk může přetrvávat u nemocného v dlouhodobé remisi onemocnění (103). Zajímavá práce italských autorů se zabývala porovnáním kvantity Bcl-2/IgH pozitivních buněk u skupiny nemocných bez nádorového onemocnění, s nádorovým onemocněním před léčbou a po léčbě (jednalo se o jiné malignity než lymfomy). Cílem práce bylo zjistit, zda kvantita Bcl-2/IgH pozitivních buněk se mezi jednotlivými skupinami liší. Předpokladem byla hypotéza, že pokud se Bcl-2/IgH pozitivní buňky nacházejí u nemocných po léčbě chemoterapií v nezměněné kvantitě, jejich prognostická hodnota k posuzování reziduální nemocni by byla zpochybnitelná. Byl zjištěn statisticky významný pokles Bcl-2/IgH pozitivních buněk po léčbě oproti ostatním dvěma skupinám. Z toho vyplývá, že „nenádorové" Bcl-2/IgH pozitivní

buňky nehrají zavádějící roli v posuzování reziduální nemoci u nemocných s maligními onemocněními nelymfomového typu. Zajímavostí této studie byla i skutečnost, že u Bcl-2/IgH pozitivních zdravých dobrovolníků došlo v 50 % ke spontánnímu vymizení Bcl-2/IgH pozitivity po 30, resp.60 dnech a naopak u zbylé poloviny došlo k perzistenci Bcl-2/IgH pozitivních buněk ve stejné kvantitě. Nabízí se hypotéza, že tyto perzistující buňky mohou být blíže „nádorovým" elementům folikulárního lymfomu než transientně se objevující populace, která vymizela během několika týdnů. Doposud tedy není zcela jasno, zda tato populace buněk s Bcl-2/IgH přestavbou není prekancerózní. Některé práce nevylučují, že tyto nemaligní cirkulující buňky mohou být v některých případech zdrojem budoucího relapsu onemocnění (104). Není ani známo, nakolik se imunitní systém dokáže těchto elementů zbavit (86).

Jisté je, že klonální přestavba zůstává před a v průběhu onemocnění identická (105). Jaký je ale vůbec prognostický význam t(14;18) jako takové v době stanovení diagnózy? Ani zde nepanují jednoznačné názory. Podle některých studií byla přítomnost t(14;18) spojena s lepší (81, 106) nebo stejnou (106, 108) prognózou onemocnění, někteří autoři jí připisují dokonce negativní prognostický význam (65, 81, 105, 106, 109).

Zajímavostí je etnická odlišnost ve frekvenci záchytu t(14;18) – zatímco v japonské populaci byla tato cytogenetická změna zachycena jen u 38 % resp.9 % nemocných s folikulárním resp.difúzním B-velkobuněčným lymfomem, v evropské populaci tomu bylo 62 % (FL) resp.18 % (DLBCL) případů (80, 110, 111). Některé studie navíc ukazují, že FL vyskytující se v Asii mají v nižším procentu prokázanou pozitivitu t(14;18) (80, 110). Hypotézou, že tento nižší výskyt t(14;18) pozitivních lymfomů v asijské populaci je způsoben obecně nižším výskytem přestavby t(14;18) v populaci, se zabývala práce amerických autorů. K porovnání sloužily vzorky s benigní lymfoidní hyperplazií od japonských a amerických pacientů. Nebyl zjištěn rozdíl v záchytu mezi oběma populacemi. Tento výsledek podporuje teorii, že proces lymfomogeneze není omezen jen na Bcl-2/IgH přestavbu, ale je tvořen více kroky, které jsou nezbytné k přerodu zdravého lymfocytu v lymfomovou buňku. Svoji úlohu v tomto mohou hrát i vlivy enviromentální (23).

Pozoruhodnou (a z klinického hlediska důležitou) klinickou jednotkou je rovněž tzv.persistentní polyklonální B-lymfocytóza. Jedná se o raritní, pravděpodobně benigní lymfoproliferativní onemocnění, které se typicky vyskytuje u mladších jedinců mezi 20.-30.rokem života, častěji u žen. Poprvé bylo popsáno v roce 1982 (90). Klinicky se projevuje polyklonální (CD19+, CD5-, normální poměr exprese kappa/lambda řetězců) lymfocytózou s paraproteinémií IgM u většiny nemocných, cytogenetickými abnormalitami postihujícími

chromozóm 3 a někdy i mírnou splenomegalií. Etiopatogeneticky jsou zkoumány u tohoto onemocnění vliv kouření a/nebo infekce Epstein-Barrovým virem (112). Morfologicky jsou přítomny typické binukleární lymfocyty v krevním nátěru. U většiny nemocných byly nalezeny přestavby Bcl-2/IgH, které byly ale mnohočetné, přesto ale velmi podobné přestavbám pozorovaným u nemocných s NHL, navíc v kvantitě, která 100-1000x převyšovala nálezy u zdravých dobrovolníků (ale stále výrazně nižší než je nalézána u nemocných s FL). Zajímavostí je, že u tohoto onemocnění nebyla zjištěna zvýšená exprese bcl-2 proteinu (i přes prokazatelně existující Bcl-2/IgH přestavbu), což svědčí o tom, že tato přestavba je pravděpodobně nefunkční a mechanismus akumulace zralých B-lymfocytů je jiný. Hlavní klinický dopad tohoto onemocnění je skutečnost, že i přes relativně významnou Bcl-2/IgH pozitivitu by nemělo dojít k mylnému zařazení mezi nádorová onemocnění. V diferenciální diagnostice lymfocytózy nejasné etiologie proto nutno vždy vyloučit tuto benigní jednotku, a to zejména na základě chybějících znaků klonality, neboť se jedná o chronické, benigní onemocnění, které nevyžaduje léčbu (89, 112).

2.6. Senzitivita t(14;18) při sledování aktivity folikulárního lymfomu

Sledování reziduální nemoci u každého nádorového onemocnění závisí na přítomnosti specifického biologického markeru, který jednoznačně charakterizuje dané onemocnění. V případě folikulárního lymfomu by tímto markerem měla být t(14;18). Frekvence jejího záchytu je ale dle literatury poměrně variabilní (19-89 %). Příčinou takto významného rozmezí jsou jednak vlivy geografické, ale zejména pak technické. Výskyt folikulárního lymfomu je obecně nižší ve východní Asii, kde představuje jen 3-13 % lymfomů (113) – v této oblasti převažují T-lymfomy. Příčinou je odlišná patogeneza lymfomů v této oblasti, jak lze demonstrovat na příkladu Burkittova lymfomu. V Asii častý „endemický" typ má oproti Evropskému „sporadickému" typu odlišná zlomová místa na chromozómech 8 i 14 (114). Problematice výskytu t(14;18) pozitivních FL ve světě se zabývá mnoho prací – z metaanalýzy 27 studií vyplývá rozdíl ve výskytu mezi Východní Asií (38 %), Evropou (61 %) a USA (71 %), jak bylo prezentováno v práci izraelských autorů (115). Problémem ale mohou být odlišné metodiky a techniky stanovení t(14;18) – i proto se autoři domnívají, že částečně je „geografický" rozdíl mezi Asií a Evropou + USA způsoben spíše technickými odlišnostmi stanovení než vlastními geografickými rozdíly (115). Aster a kol. nenašli rozdíly ve frekvenci t(14;18) pozitivních nálezů v benigních lézích hyperplastických tonzil mezi japonskou a americkou populací – jednalo se ale o poměrně malou studii o 25 pacientech (23). Oproti

tomu poměrně velká studie porovnávající výskyt Bcl-2/IgH přestavby ve vzorcích krve mezi japonskou (241 probandů) a německou (75 probandů) populací zdravých dobrovolníků prokázala statisticky významný rozdíl ve výskytu této přestavby (16.2 % vs. 52 %) ve prospěch německé skupiny. V japonské skupině nebyl zjištěn jinde popisovaný nárůst výskytu t(14;18) s věkem. Rozdílné výsledky mezi výše zmíněnými 2 studiemi mohou být způsobeny jednak odlišným zkoumaným materiálem a dále rozdílnými počty v obou studiích. Příčiny nižšího výskytu t(14;18) u zdravých jedinců v Japonsku ale nejsou známy. Příčinou mohou být genetické příčiny nebo vliv životního prostředí (116).
Zajímavostí je nízká incidence FL v ekvádorské populaci, kde mezi 6 % nemocných s FL nebyl nalezen žádný nemocný s t(14;18) (117). Geografické rozdíly v distribuci jednotlivých subtypů NHL ale byly v literatuře popsány (118).

2.7. Je translokace t(14;18) charakteristická pro všechny folikulární lymfomy?

Folikulární lymfom je charakteristický svoji molekulárně genetickou přestavbou – translokací t(14;18)(q32;q21), která vede ke zvýšené expresi Bcl-2 genu, který za normálních podmínek není exprimován na buňkách germinálního centra (119, 120). Chromozomální změny jsou u FL ale často komplexní, a tak v některých případech může být t(14;18) maskována sekundárním změnami karyotypu. Kromě histologie je pro potvrzení této diagnózy používáno mnoha dalších metod. Zvýšená exprese bcl-2 proteinu imunohistochemicky je prokazatelná u více jak 90 % případů, ale není specifická jen pro FL (120, 121). PCR metody i přes svoji vysokou citlivost při použití primerů pro nejčastěji udávaná zlomová místa MBR a mcr také nedokáží zachytit 10-15 % případů, kdy zlomové místo je mimo výše zmíněné 2 nejčastější oblasti (81). Klasické cytogenetické metody jsou přínosné k detekci chromozomálních změn, ale mají své limitace, jako např.nutnost vyšetření čerstvých, nativních vzorků. I zde se záchytnost t(14;18) pohybuje jen kolem 75 % případů (120). Interfázová fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se jeví jako nejcitlivější metoda ke stanovení t(14;18), a to v 85-100 % případů (122, 123). Její výhodou je i skutečnost, že můžeme vyšetřovat vzorky z parafínových bločků, nikoliv pouze nativní tkáň. Některé její varianty, jako např.Godenem prezentovaná „colocalization-based FISH" dokázala identifikovat translokaci t(14;18) u 63/63 (100 %) vzorků nemocných s folikulárním lymfomem (124).

Význam nezbytnosti kombinování těchto metod ukazuje následující příklad: v jedné ze studií byla provedena podrobná analýza 154 pacientů s podezřením na lymfom pomocí chromozomální analýzy, vícebarevného spektrálního karyotypování (SKY) a interfázové FISH. Cytogenetické výsledky byly získány od 103 případů (67 %), přičemž 38 bylo normálních a v 65 případech byl zjištěn patologický karyotyp. Z 24 abnormálních karyotypů u nemocných s FL byla zjištěna t(14;18) pomocí klasického karyotypu u 17 případů (71 %), další 3 pozitivní nálezy t(14;18) byly objeveny až při FISH (a tedy unikly při PCR) a jen ve 4 případech byl výsledek negativní - u těchto 4 pacientů se jednalo o komplexní chromozomální přestavby. U jedinců s prokázanou t(14;18) byly navíc často objeveny sekundární cytogenetické abnormality, které zahrnovaly nejčastěji 6q-, 1p36-, +7, +12, což podporuje klonálně evoluční teorii sekundárních změn jako základní krok pro transformaci FL do agresivnějších lymfomů. (125).

Dalším důkazem pro nezbytnost kombinace diagnostických metod pochází i z českého pracoviště. Autoři Janíková-Obořilová a kol.prokázali pomocí kombinace FISH a PCR metod t(14;18) pozitivitu u 112/115 nemocných s FL (97%). Přitom samotnou PCR detekovali t(14;18) pozitivní buňky jen v 54 % (159).

Francouzská studie Tillyho a kol.na vzorcích od 66 nemocných s FL prokázala významně negativní dopad delece 6q23-26 a delece 17p na prognózu nemocných. Tato skupina měla i vyšší riziko transformace v agresivní lymfom (106). Podobné výsledky publikovali holandští autoři, kteří zachytili t(14;18) pomocí interfázické FISH u 35/40 (87,5 %) folikulárních lymfomů. U t(14;18) negativních pacientů byla pozorována negativita i při imunohistochemickém průkazu bcl-2 proteinu (123).

2.8. Existují t(14;18) negativní folikulární lymfomy?

Skupina FL t(14;18) negativních je z diagnostického hlediska velmi zajímavá a byla studována několika autory. U těchto nemocných, Bcl-2/IgH negativních, byla naopak zjištěna zvýšená exprese Bcl-6 genu, která je způsobena přestavbou oblasti 3q27 – nejčastěji translokací na chromozóm 14. Produkt zvýšené exprese Bcl-6 genu, bcl-6 protein, je fyziologicky přítomen na buňkách germinálního centra a ovlivňuje jeho funkci a vývoj (126). Jakým způsobem se podílí jeho zvýšená exprese, není zatím vyřešeno. Některé práce hovoří o jeho proapoptotickém efektu (127, 128), jiné tuto teorii popírají a hovoří o jeho antiapoptotické funkci (129). Tato pozorování ukazují, že role Bcl-6 genu není zatím

prozkoumána definitivně, nelze vyloučit, že záleží i na buněčném typu, kde je exprimován (130). Vraťme se ale k t(14;18) negativním lymfomům. Některé práce popisují možnosti koexistence obou molekulárně genetických změn - t(14;18) i t(3;14) u jednoho pacienta (131), jiní autoři popisují exkluzívnost obou změn (132). Existuje předpoklad, že FL neexprimující t(14;18) a naopak 3q27 pozitivní představují samostatný typ folikulárního lymfomu - skupina těchto nemocných byla sledována ve studii Jardina a kol. Oproti klasickému, t(14;18) pozitivnímu (a 3q27 negativnímu) FL, bylo zjištěno několik rozdílů: morfologicky se tento typ FL odlišoval zvýrazněnou folikulární strukturou a většími folikuly, imunohistochemicky pak CD10 negativitou a Bcl-6 pozitivitou (jako produktu translokace t(3;14). Zvýšená exprese Bcl-6 je nalézána typicky u DLBCL (133, 134), proto se ale autoři domnívají, že část nemocných z této skupiny tvoří FL transformující se do DLBCL. Porovnáním skupiny 3q27 pozitivních a t(14;18) negativních lymfomů s klasickým FL nebyly zjištěny rozdíly v prognóze onemocnění stran celkového přežití. Klinický význam této podskupiny zůstává proto nadále ne zcela jasný (130).

Porovnáním podskupin FL grade 3A a 3B v práci Otta a kol. bylo zjištěno, že většina (73 %) FL gr.3A byla t(14;18) pozitivní a naopak 3q27 negativní, skupina FL gr.3B vykazovala častěji 3q27 pozitivitu (37 %) oproti skupině FL gr.3A, kde byla zachycena přestavba 3q27 jen v 18%. Podrobným cytogenetickým vyšetřením bylo zjištěno, že jedinci s FL gr.3B jsou často t(14;18) negativní a 3q27 pozitivní, jak bývá nalézáno u DLBCL (132, 135). Všechny tyto výsledky podporují teorii, že FL gr. 3A patří k indolentním FL, zatímco FL gr.3B se blíží více DLBCL (136).

Velká analýza 50 t(14;18) negativních FL byla publikována Horsmanem a kol.v roce 2002. Autoři vybrali skupinu 50 nemocných s FL s jasně vyloučenou přítomností t(14;18) pomocí kombinované genetické analýzy. I přesto byla zjištěna u 33 % zvýšená exprese bcl-2 proteinu – mechanismus zvýšené exprese jistě nebyl podmíněn Bcl-2/IgH přestavbou. Na zvýšené expresi se proto pravděpodobně podílejí i jiné, dosud nepoznané mechanismy. Většina souboru (67 %) byla Bcl-2/IgH negativní. Většina z těchto nemocných měla prokázánu strukturální přestavbu 3q27, a tedy opět zvýšenou expresi Bcl-6 (50). Odpověď na vstupní otázku, zda existují t(14;18) negativní FL by mohla být následující: FL t(14;18) negativní existují, většina z nich má prokazatelnou deregulaci Bcl-6 genu jako následek 3q27 přestavby a histologicky se jedná častěji o FL gr.3B, tedy lymfom, blížící se svým biologickým chováním k DLBCL. Význam této podskupiny stran prognózy oproti ostatním FL zůstává ale nejasný (137).

2.9. Jaký je klinický význam translokace t(14;18)?

Detekce tohoto molekulárně genetického markeru má z klinického hlediska několikerý význam. Slouží zejména k:

a) potvrzení diagnózy FL (63)
b) posouzení minimální reziduální nemoci (138, 139)
c) zhodnocení prognostického rizika FL a DLBCL (36)
d) vyhodnocování efektu nových léčebných postupů (140)

Z tohoto důvodu je nezbytné, aby senzitivita a specificita všech testů, které jsou k dispozici pro detekci t(14;18) pozitivních elementů, byla validována.

2.10. Technické aspekty detekce translokace t(14;18)

Značná variabilita prezentovaných výsledků stran záchytu t(14;18) mezi jednotlivými pracemi (19-89 %) je způsobena pravděpodobně jen v malé míře geografickými odlišnostmi (63, 141, 142). Nabízí se tedy otázka, zda je tento problém otázkou technických schopností dané laboratoře detekovat t(14;18), nebo zda tento molekulárně genetický marker je skutečně tak variabilní a nekonstantní. Zásadní roli v tomto hraje skutečnost, že identifikace t(14;18), resp.Bcl-2/IgH přestavby je možná celou řadou technik a metodik, které se liší svojí citlivostí, přesností i mírou senzitivity i specificity. Navíc zde hraje důležitou roli již zmíněná skutečnost, že t(14;18) je přítomna i u zdravých jedinců, a proto je v některých případech těžké nebo zcela nemožné odlišit reziduální lymfomové buňky nesoucí t(14;18) od zdravých, nenádorových elementů se stejnou přestavbou. Jaké tedy máme k dispozici techniky pro detekci t(14;18)? Pokusíme se je probrat jednotlivě a poukázat na výhody a nevýhody jednotlivých detekčních metod:

1. **klasická cytogenetika:** její výhodou je technická i finanční relativní nenáročnost v porovnání s ostatními metodami. Navíc poskytuje relativně nejkomplexnější možnost posouzení všech chromozomálních změn, tedy nejen t(14;18), ale i ostatních, přídatných chromozomální změn, které ostatní, „cílené" metody nepostihnou. Metoda má ale své limitace:

a) nutnost vyšetření čerstvých, nativních vzorků (tím pádem nelze vyšetřovat vzorky v rámci retrospektivních studií) (143).
b) úspěšné chromozomální analýze u indolentních lymfomů brání nízká výtěžnost viabilních buněk v metafázi (143).
c) karyotyp u FL může být falešně negativní, protože metafáze mohou být vyšetřovány z normálních buněk místo nádorových elementů, které jsou v minoritním zastoupení (143)
d) toto vyšetření není schopno odlišit t(14;18)(q32;q21) – IgH/Bcl-2 od t(14;18)(q32;q21) - IgH/MALT1, která je asociována extranodálními MALT lymfomy. To pak může činit klinikům problém v diferenciální diagnostice obou jednotek (143).

Záchytnost t(14;18) při klasickém cytogenetickém vyšetření pohybuje kolem 75 % (120). Navíc v případě komplexních přestaveb může být těmito změnami t(14;18) „maskována" a obtížně detekovatelná. Většinu z výše zmíněných nevýhod postrádají další dvě metody - PCR a FISH. Obě tyto metody jsou sice také limitované technickými problémy, více tomu ale je u PCR.

2. **PCR** – její využití pro detekci t(14;18) je velmi rozšířeno. Její výhodou je snadnost, rychlost a vysoká citlivost. Princip spočívá ve využití specifických primerů, které se cíleně vážou na definované sekvence DNA v rámci vyšetřované přestavby. Po navázání primerů na specifická vazebná místa v blízkosti příslušné genetické změny dochází k procesu amplifikace úseku mezi primery (opakovanými změnami teploty). Amplifikovaný produkt v případě přítomnosti dané chromozomální změny je poté vizuálně detekován pomocí polyakrylamidové elektoforézy. Klinicky je tato metoda používána jak pro stanovení diagnózy FL, tak i pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN). Vzhledem ke své jednoduchosti je v současné době PCR asi nejpoužívanější metodou pro detekci (14;18). Výtěžnost záchytu t(14;18)(q32;q21) pomocí PCR závisí na použitém typu PCR vyšetření, zda se jedná o jednokolovou, či dvoukolovou, nested či jiné varianty PCR. Rozmezí záchytu se pohybuje mezi 42-65 % ze vzorků histologicky verifikovaných folikulárních lymfomů (66, 109, 143, 144, 145, 146).

a) **standardní PCR** metodiky byly založeny na předpokladu existence 2 základních zlomových míst, a to MBR a mcr. Kombinací primerů pro tato zlomová místa s JH konsesuálními primery lze získat produkty o velikosti 150-500 kb, a to dokonce i z parafinových bločků. Touto metodou ale nelze detekovat zlomy spadající mimo oblast MCR a mbr – jak vyplývá z výsledků studií, výskyt atypických zlomových míst je vyšší než se původně předpokládalo a někteří autoři uvádějí až 50 % (74, 75). Například v oblasti intermediate cluster region (icr) byla nalezena 3x vyšší frekvence zlomů než v oblasti mcr. I když klasickou PCR obohatíme o primery specifické pro icr, stále cca 1/3 zlomů uniká (75). Navíc každá translokace je z určitého pohledu „unikátní" jako výsledek zlomů v odlišných místech s možností další, nepravidelné inserce nukleotidů. Takto můžeme sledovat individuálně specifické klony během celé doby sledování nemocného. Z klinického hlediska jsou popisovány 2 typy klasické PCR reakce: méně citlivá, jednokolová PCR (detekční mez $1:10^4$ lymfomových buněk) nebo dvoukolová, nested PCR (citlivost $1:10^5$ nádorových buněk). V literatuře je publikována celá řada prací z mnoha pracovišť ve světě, které používají tyto metodiky ke stanovení (14;18) pozitivních buněk. Odlišné závěry některých prací ale mohou být způsobeny i odlišnostmi v citlivosti jednotlivých variant těchto technik v závislosti na odlišných primerech, metodách amplifikace nebo detekce produktu. Z tohoto důvodu proběhla ke konci 90.let minulého století multicentrická studie, která zahrnovala 20 laboratoří, které prezentovaly výsledky PCR monitorování s cílem zjistit míru reprodukovatelnosti výsledků mezi laboratořemi. Ze závěrů této studie vyplývá, že od hladiny 100 Bcl-2/IgH pozitivních buněk/ml krve výše byla nalezena vysoká shoda přesahující 90 %, a to jak mezi laboratořemi, tak i oběma variantami PCR (jednokolová a nested PCR). Při vyšetřování vzorků obsahující 100 a méně Bcl-2/IgH pozitivních buněk/ml krve ale již byly výsledky méně uspokojivé, přičemž vyšší záchytnost byla pozorována u nested PCR (79 %) oproti jednokolové PCR (31 %) – rozdíl byl statisticky signifikantní ($p=0.0002$). Zklamáním pak bylo relativně vysoké procento falešně pozitivních výsledků (28 %), které bylo významnější u nested PCR (33 %), u jednokolové PCR pak 19 % - tento rozdíl je dán vyšší citlivostí nested PCR. Jako možná příčina vysokého procenta falešně pozitivních výsledků byla autory zvažována možnost kontaminace mezi vzorky při vyšetřování v laboratořích (142). Výsledky ale celkově nebyly příliš povzbudivé, a z tohoto důvodu byla snaha vyvinout citlivější modifikace PCR metody.

b) **long distance PCR** (LD-PCR) je variantou PCR, která má hlavní výhodu oproti primer-specifické PCR v možnosti amplifikace genových úseků o velikosti až 23 kB. Poprvé byla prezentována japonskými autory – Akasaka a kol. (74). Primery jsou vytvořeny tak, aby nasedaly na dostatečně vzdálená místa od klasických zlomových míst MBR a mcr. Tímto způsobem je možno detekovat podstatně více typů translokací než klasickou PCR. Senzitivita při amplifikaci genů do 12kB je 1:10 000 nádorových buněk. Ve studii Akasaky a kol.(74) byl prokázán záchyt t(14;18) ve všech 52 vyšetřovaných vzorcích, a to nejčastěji v oblasti MBR (64 %), poté dle frekvence v Far 3´ MBR (14 %), 5´mcr (12 %), 3´MBR (5 %) a mcr (5 %). Albinger a kol. prokázali výskyt t(14;18) pomocí LD-PCR v 71 % případů folikulárních lymfomů (75)

c) **multiplex PCR** – jedná se o variantu PCR, při které mohou být amplifikovány 2 a více sekvence díky použití více párů primerů. Tato metoda dokáže proto ušetřit při diagnostice mnoho času a úsilí. Poprvé byla popsána v roce 1988 (147) a od té doby byla použita v diagnostice DNA v mnoha oblastech – při detekcích genových delecí, polymorfismů, reverzně-transkriptázové PCR aj.(148, 149). Multiplex PCR se často využívá i v detekci infekčních agens, jak virových, tak i bakteriálních (150). Přestože se jedná o zajímavou metodu, její hlavní limitace spočívají ve vysoké náročnosti na reakční podmínky (teplota, koncentrace pufrujících roztoků, množství použitých primerů atd.). Otázkou zůstává, jaké množství sekvencí je možno detekovat současně z hlediska správné interpretace výsledků – maximálně bylo referováno 9 najednou amplifikovaných segmentů během jednoho vyšetření (151). Někteří autoři popisují variantu multiplex PCR – tzv.multicolor multiplex PCR, která je schopna během 1 reakce diagnostikovat B resp.T klonalitu ve spojení s detekcí t(11;14) či t(14;18) – tedy 2 nejčastějších cytogenetických změn u lymfomu z pláš'tových buněk, resp.folikulárního lymfomu. Tato metoda by se mohla uplatnit v rychlé diagnostice lymfoproliferativních stavů, protože produkty amplifikace jsou vyhodnocovány automaticky přístrojem. Předností této metody je i vysoká senzitivita (152). Přestože všechny varianty multiplex PCR představují nadějné způsoby detekce, další ověření těchto metod je nezbytné.

d) **kvantitativní real-time PCR** je možno dosáhnout přesné kvantifikace t(14;18) pozitivních buněk. Tato metoda je stejně senzitivní, ale kvantitativně mnohem více výtěžná než klasická jednokolová nebo nested PCR (99, 142). Byly vyvinuty i další varianty této metody, jako např.multiplex real-time PCR spojená s kapilární

elektroforézou. Výhodou této modifikace je možnost současně měřit současně t(14;18) i kontrolní gen (cyclophillin) v jedné reakci – tím se eliminuje riziko chyb spojených s dvojím pipetováním, navíc celá reakce je rychlejší, protože probíhá současně. Kapilární elektroforéza pak umožňuje kvalitativní rozlišení fluorescenčně označeného amplifikovaného produktu, a tím je možno vyloučit kontaminaci vzorku. Tato metoda se často používá pro průkaz shodnosti klonality před a po léčbě (153). Tato metodika v současné době představuje asi nejlepší variantu kvantifikace t(14;18) u FL.

Jaká je ale reprodukovatelnost výsledků testování vzorků pomocí real-time PCR? V minulosti byly prezentovány Johnsnem a kol. velmi rozporuplné výsledky, kdy při porovnání 20 laboratoří v rámci testování konvenční PCR techniky byla ukázána až 28 % falešná pozitivita výsledků (152). Reprodukovatelností výsledků real-time PCR se zabývala multicentrická studie porovnávající výsledky z 12 mezinárodních laboratoří, kterým byly s časovým odstupem v rámci dvoukolového měření zaslány zaslepené 2 vzorky krve od zdravého dárce s přesně definovaným množstvím t(14;18) pozitivních buněk získaných z buněčné linie s translokací v oblasti MBR. Všechna centra používala stejný přístroj pro detekci (ABI 7700) a stejné enzymy. Použití primer specifických prób záviselo na praxi jednotlivých center. Z výsledků vyplývá, že většina center dokázala detekovat pozitivitu od hranice 100 t(14;18) pozitivních buněk na mililitr (ml) – a to v 80 %, resp.94 % vzorků v prvním, resp.druhém kole stanovení. Pouze v jednom případě byl nalezen falešně pozitivní výsledek, a to zřejmě díky kontaminaci (odlišný amplifikovaný produkt). I přes tyto, relativně povzbudivé výsledky byly nalezeny odchylky – a to v rámci některých center až v řádu 2 logaritmů. Navíc u vzorků pod hranicí 20 resp.jednu t(14;18) buňku na ml byl zjištěn pozitivní výsledek jen v 50 % resp.9 %. Přes tyto limitace zůstává real-time PCR velmi vhodnou metodou detekce t(14;18) pozitivních buněk (154).

3. FISH – úspěšnost detekce t(14;18) pomocí fluorescenční in situ hybridizace může rovněž ovlivnit několik faktorů – stáří bločku, typ fixačního prostředku či proces ukládání vzorku do parafinu. FISH je jistě více senzitivní než PCR, protože je schopna detekovat zlomová místa, která leží i mimo oblasti vyšetřitelné specifickými PCR primery, a není tudíž vyžadována absolutní komplementarita. Záchytnost t(14;18) pomocí FISH se pohybuje mezi 56-100 % (123, 124, 155, 156, 157). FISH má oproti PCR výhodu ve vyšší úspěšnosti detekce a lepší senzitivitě, může od sebe rozlišit podobné cytogenetické změny jako jsou IgH/Bcl-2 u FL od IgH/MALT1 u MALT lymfomu, dokáže detekovat i atypické

translokace zaujímající chromozóm 18, jako jsou t (2;18) a t(18;22), které zahrnují geny pro lehké řetězce imunoglobulinů kappa a lambda (77, 78). V porovnání s PCR jsme díky FISH schopni detekovat i komplexní signály, ukazující na možné komplexní změny karyotypu (143). Nevýhodou FISH je její větší časová i technická náročnost, což z ní činí méně výhodnou metodu pro sledování dynamiky cytogenetických změn.

2.11. Jaký je optimální kompartment pro sledování t(14;18)?

Problémem je také stanovení optimálního kompartmentu ke sledování aktivity onemocnění. Z hlediska geneze NHL by se jevil jako ideální vzorek mízní uzliny. Ten je zpravidla dostupný při diagnóze, avšak během terapie či po jejím ukončení již většinou nikoliv. Rebiopsie je většinou indikována jen v případě podezření na transformaci lymfomu do agresivnějšího typu – podezření na transformaci máme při rychle rostoucí nádorové mase, zejména v jedné oblasti, spojené se vzestupem laktátdehydrogenázy (LDH). Z tohoto důvodu je lymfatická uzlina jako materiál z hlediska dlouhodobého sledování nemocných nevhodná. Z klinického hlediska se proto setkáváme nejčastěji s analýzou vzorků kostní dřeně a/nebo periferní krve. Je ovšem otázkou, zda nálezy v periferní krvi či kostní dřeni korelují s aktivitou onemocnění, které je primárně lokalizováno v mízních uzlinách. Ani v této oblasti nepanuje v literatuře shoda. Některé práce prokazují shodu mezi záchytem t(14;18) v lymfatické uzlině a v kostní dřeni. Ve studii z roku 1991 byla sledována shoda mezi PCR vyšetřením mízních uzlin a kostní dřeně na přítomnost t(14;18). Mízní uzlina měla z tohoto hlediska stejnou výtěžnost jako vzorek kostní dřeně v době diagnózy folikulárního lymfomu (158). Naopak v práci brněnských autorů, kteří zkoumali pomocí kvantitativní real-time PCR množství bcl-2/IgH pozitivních buněk ve vzorcích uzlin i kostní dřeně, byl zjištěn v mízních uzlinách statisticky významně vyšší počet oproti kostní dřeni ($p=0,036$), a oproti periferní krvi ($p=0,014$) rovněž (159). Zajímavostí je, že některé studie prokazují přetrvávání t(14;18) pozitivních buněk v periferní krvi i u jedinců v dlouhodobé kompletní remisi po léčbě lokalizovaných stadií FL pomocí samotného ozáření (60). Obdobné závěry byly publikovány i jinými autory (58). Existují ale i práce, které shodu mezi záchytem t(14;18) v lymfatických uzlinách a kostní dření, resp.periferní krví neprokazují. V rámci 2 pilotních studií týkajících se zkoumání efektu monoterapie rituximabem u relabujících folikulárních lymfomů byla zjištěna přítomnost t(14;18) pozitivních buněk ve vzorcích uzlin v 80 %, zatímco v kostní dřeni a periferní krvi jen v cca 40-45 %, tedy poloviční (146). Oproti tomu u nemocných s nově diagnostikovaným onemocněním je ze vzorků periferní krve prezentován záchyt

t(14;18) buněk až 82 % (160). Několik dalších prací se zabývalo otázkou, nakolik jsou kostní dřeň a periferní krev srovnatelné pro monitorování reziduální nemoci po léčbě. Summersová a kol. zkoumali shodu mezi nálezy t(14;18) pozitivních buněk v kostní dřeni a periferní krvi u souboru 38 pacientů s FL – část z nemocných byla v remisi, část měla aktivní onemocnění. U obou skupin konstatovali relativní shodu mezi výsledky t(14;18) ze vzorků periferní krve a kostní dřeně – přestože celkový počet t(14;18) buněk nalezených v kostní dřeni byl vyšší než v periferní krvi, nebyl tento rozdíl větší než jeden logaritmus. Pro sledování nemocných v remisi by dle této práce bylo dostačující vyšetřování periferní krve (161). Obdobné informace byly prezentovány i z M.D.Anderson Cancer Centre (160). Ze stejného pracoviště pochází i práce srovnávající oba kompartmenty pomocí real-time PCR v kombinaci s kapilární elektroforézou s vysokým rozlišením. Jedná se asi o nejpřesnější metodu detekce t(14;18) pozitivních buněk – kromě možnosti kvantifikace produktu lze díky elektroforetickému vyšetření určit přesný typ Bcl-2/IgH sekvence, a porovnat tak například vzorek vyšetřované periferní krve či kostní dřeně s původním vzorkem mízní uzliny. V této studii bylo vyšetřeno 60 konsekutivních nemocných s FL. Byla shledána významná (82 %) shoda mezi vzorky periferní krve a kostní dřeně, a to ještě významnější u těch pacientů, kde bylo masivní postižení dřeně lymfomem. Pro tuto skupinu byly výsledky natolik přesvědčivé, že autoři zvažují, že tato molekulárně genetická metoda by mohla v některých případech nahradit klasické vyšetření nádorové tkáně při stanovení diagnózy. U vzorků, kde bylo postižení naopak minimální, uvádějí autoři jako dolní hranici jednu t(14;18) pozitivní buňku na 3000 zdravých – pod tuto mez lze uvažovat o „falešné pozitivitě", která může být způsobena přítomností nenádorových t(14;18) pozitivních elementů – jedná se o jakési hranice „přirozeného pozadí". V případě hraničních hodnot t(14;18) pozitivních buněk a vznikající pochybnosti o jejich lymfomovém původu je doporučeno současně zanalyzovat typ přestavby ve vzorků původního tumoru. Na základě výše uvedených výsledků autoři konstatují, že při použití této velmi citlivé PCR metodiky lze pro účel sledování MRN vyšetřovat jen periferní krev (162).

Periferní krev byla shledána jako spolehlivý kompartment pro sledování reziduální nemoci i u nemocných po autologní transplantaci (144). Jiné práce ale tuto shodu nepodporují. Podle Gribbena a spoluautorů, kteří studovali nemocné s FL před a po autologní transplantaci, bylo prokázáno, že periferní krev je podstatné méně vypovídající stran záchytu t(14;18) pozitivních buněk než kostní dřeň. Přestože postižení kostní dřeně t(14;18) elementy bylo v době před sběrem periferních kmenových buněk nalezeno u 99 % pacientů, pozitivní nález v periferní krvi ve stejnou dobu mělo jen 49 % nemocných. Autoři této práce proto

konstatují, že kostní dřeň je více vypovídající stran reziduální nemoci než periferní krev a navíc, výsledky ze dřeně jsou signifikantně více prediktivní stran relapsu onemocnění. Zajímavým nálezem v této studii byla skutečnost, že pomocí PCR bylo možno detekovat cirkulující lymfomové buňky do 2 hodin od převodu kostní dřeně obsahující t(14;18) pozitivní elementy. Celkově lze shrnout, že přestože některé studie naznačují možnou zaměnitelnost kostní dřeně a periferní krve v detekci reziduální nemoci u FL, výsledky většiny studií se shodují na tom, že k monitorování minimální reziduální nemoci po léčbě je přesnější vyšetřování kostní dřeně neboť po dosažení molekulární remise v periferní krvi přetrvává u mnoha nemocných molekulární pozitivita v kostní dřeni (163, 164, 165).

2.12. Význam molekulární remise po léčbě

2.12. 1. Význam molekulární remise po standardní terapii

Podání samotné chemoterapie umožňuje dosažení molekulárně genetické remise. Ve studii z M.D.Anderson Cancer Centre v Houstonu u 116 nemocných s FL a detekovatelnou přestavbou t(14;18) z periferní krve celkem 88 % nemocných mělo pomocí jednokolové PCR detekovatelnou přestavbu v oblasti MBR, 12 % pak v mcr oblasti. Nemocní byli léčeni protokolem ATT (tzv."alternative triple therapy") nebo režimem FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethason) s následnou udržovací léčbou INF alfa. Během prvního roku léčby dosáhlo 80 % klinicky kompletní remise, 69 % z nich dokonce molekulárně genetické remise. Nebyl pozorován rozdíl mezi pravděpodobností dosažení remise mezi oběma užitými režimy. Pětileté přežití bez nemoci bylo významně lepší ve skupině pacientů, kteří dosáhli molekulární remisi (73 %) oproti non-respondérům (28 %) – $p<0.001$, přesto ale nebylo na křivce „respondérů" dosaženo plató, a tudíž lze předpokládat, že i u nemocných v molekulárně genetické remisi trvá riziko relapsu (165, 166). Práce tak jen potvrzuje výsledky ze stejného pracoviště prezentované v roce 1998 (160). Význam t(14;18) jako prognostického faktoru po standardní chemoterapii potvrzuje studie porovnávající efektivitu režimu FND a ATT u primární terapie pokročilých stadií folikulárních lymfomů. Oba režimy dosáhly vysokého procenta léčebných odpovědí (97 %). V molekulárně genetické části studie byl potvrzen význam dosažení PCR negativity – jedinci, kteří během léčby dosáhli t(14;18) negativity, měli pětileté přežití 95 % oproti jedincům, kteří nedosáhli PCR negativity (76 %). Mezi oběma léčebnými rameny nebyl zjištěn rozdíl v dosažených molekulárně genetických

remisích, z klinického hlediska jedinci léčení ATT měli pravděpodobnost delšího období bez selhání terapie než skupina léčená FND. Celkové přežití bylo v obou skupinách shodné (167).

Ve studii publikované italskými autory (Rambaldi a kol.) dosáhlo po 6 cyklech CHOP molekulárně genetické remise více jak třetina nemocných. U další části nemocných došlo k dosažení molekulární negativity po 4 dávkách rituximabu, který byl v této studii podáván nemocným, u kterých přetrvávala po chemoterapii CHOP PCR aktivita t(14;18) (164). Ze stejného pracoviště i studie jsou pak i výsledky kvantitativního monitorování t(14;18) pomocí kvantitativní real-time PCR, která prokázala v 5 letech od léčby signifikantně vyšší procento nemocných bez rekurence choroby (64 %) než ve skupině s přetrvávající t(14;18) pozitivitou (32 %, $p<0.006$) (168). Pozitivní korelaci mezi dosažením molekulární remise a lepší prognózou nemocných s FL prokázala i práce francouzských autorů, kteří vyšetřili 180 vzorků periferní krve od 25 pacientů s FL před léčbou a pak opakovaně během léčby a po jejím ukončení. Přestože se nejednalo o homogenní skupinu stran použité léčby (COP, chlorambucil v monoterapii, Fludarabin a další), byla zjištěna významná korelace jak mezi dosažením molekulární remise a klinickou remisí ($p=0.002$), tak obdobím do progrese ($p=0.005$), i byl naznačen trend lepšího celkového přežití ($p=0.06$) u skupiny, která dosáhla t(14;18) PCR negativity (169).

Některé studie ale vztah mezi dosažením molekulárně genetické remise a prognózou onemocnění neprokázaly (170). Ve studii holandských autorů bylo sledováno 34 pacientů s nově diagnostikovaným FL pokročilého stadia. Nemocní byli léčeni 8 cykly COP s následnou udržovací terapií interferonem alfa-2b. Molekulárně genetická studie byla prováděna pomocí real-time PCR. Přestože procento nemocných, kteří dosáhli t(14;18) negativity, bylo poměrně vysoké (76 %), dosažení molekulární remise naprosto nekorelovalo s klinickým efektem. Ve skupině nemocných, kde došlo k rychlému poklesu t(14;18) pozitivních buněk, byli i 4 nemocní se selháním léčby a naopak ve skupině nemocných, kde bylo klinicky dosaženo kompletní remise, přetrvávaly t(14;18) pozitivní buňky. Vedlejším nálezem bylo nižší zastoupení t(14;18) pozitivních buněk u nemocných s „bulky" onemocněním, což je vysvětlováno zvýšenou expresí receptorů adhezívních molekul (jako např.L-selektin) v bulky masách, což vede k tzv. "homingu" lymfomových buněk do těchto konglomerátů místo osídlování kostní dřeně či periferní krve (171).

Rozporuplné výsledky na otázku významu dosažení molekulárně – genetické remise na prognózu nemocných s folikulárním lymfomem prezentovala i Janíkova a kol.v roce 2007. Autoři sledovali 115 pacientů s folikulárním lymfomem pomocí FISH, dvoukolové nested PCR a multiplex PCR. Vyšetřovali vzorky periferní krve, dřeně i uzlin u nemocných

léčených několika typy standardní chemoterapie. Pacienty s přestavbou v oblasti MBR pak sledovali dlouhodobě pomocí kvantitativní real-time PCR. Přestože u 61 % nemocných koreloval klinický a molekulárně genetický průběh onemocnění velmi dobře, 21 % sledovaných pacientů klinicky zrelabovala v trvalé molekulární remisi. Autoři se proto domnívají, že význam molekulárně genetického sledování z hlediska klinického průběhu a volby léčby je stále omezený (159).

Gribben a kol.vyšetřoval u nemocných s FL před autologní transplantací štěp kostní dřeně na přítomnost lymfomových, t(14;18) pozitivních buněk, a zjistil pomocí PCR kontaminaci u všech 74 nemocných. Z toho vyplývá, že podání indukční chemoterapie CHOP nevedlo k dosažení molekulárně genetické remise u žádného z nemocných (82). Obdobné výsledky přinesli i čeští autoři z olomouckého pracoviště, kde po podání samotné chemoterapie bylo dosaženo molekulárně genetické remise stran t(14;18) negativity jen u 6 % nemocných s folikulárním lymfomem, na druhou stranu ale 3/5 nemocných s DLBCL molekulární remise po samotné chemoterapii dosáhli (66).

Pozoruhodné sdělení se týká možnosti dosažení molekulární remise po samotné radioterapii. Ha a kol. spoluautorů z M.D.Anderson Cancer Centre prezentovali výsledky molekulárně genetického sledování 20 pacientů stadia I-III folikulárního lymfomu, kteří byli léčeni samotnou radioterapií - ozářením všech oblastí mízních uzlin (TLNI – total lymph node irradiation). U všech nemocných byly detekovány v úvodu onemocnění t(14;18) pozitivní buňky pomocí PCR. K velkému překvapení zjistili, že u u 8 z 9 pozitivních vzorků z periferní krve a u 2 ze 3 pozitivních vzorků kostní dřeně došlo po radioterapii ke konverzi do negativity (postižení dřeně v úvodu onemocnění bylo okultní – jednalo se o pacienty stadií I-III). Všichni pacienti dosáhli po této léčbě kompletní remise při mediánu sledování 22 měsíců v době hodnocení. Mechanismus vymizení t(14;18) pozitivních buněk není vysvětlen, ale pravděpodobně se při ozáření uplatňuje nejen samotný lokální efekt radioterapie (172).
Přestože výsledky prezentovaných studií jsou rozporuplné, lze konstatovat, že některé chemoterapeutické režimy (většinou intenzivnější) jsou schopny dosažení molekulárně genetické remise. Její význam pro osud onemocnění nutno ověřit v rámci dalších prospektivních studií.

2.12.2. Molekulární remise a autologní transplantace

Vysokodávkovaná léčba s autologní transplantací periferních kmenových buněk (ASCT) byla zavedena do léčby NHL od osmdesátých let minulého století (173). U nemocných s relapsem folikulárního lymfomu bylo publikováno několik studií s velmi povzbudivými výsledky, včetně vysokého procenta dosažených CR i molekulárních remisí (174-176). I přes prodloužení trvání remise onemocnění a prodloužení období bez známek nemoci žádná studie neprokázala benefit v celkovém přežití oproti nemocným léčeným konvenční léčbou (174, 177). Použití ASCT v léčbě první linie je věnováno také několik prací s rovněž slibnými výsledky, přestože tato indikace je mnohem kontroverznější (146, 177, 178), a to z důvodu poměrně vysokého rizika zejména pozdní toxicity, která se může projevovat sekundárním myelodysplastickým syndromem (MDS), akutní myeloidní leukémií (AML) či jinými nádory. Některé práce popisují až 20 % riziko v 10 letech (178), což je u onemocnění se značně variabilním přirozeným průběhem, kde část nemocných nevyžaduje dlouho žádnou léčbu, poměrně vysoké riziko.

Hodnocením molekulárně genetické remise po ASCT se zabývá několik autorů. Apostolidis a kol. prezentovali výsledky autologně transplantovaných na souboru 99 pacientů v 1.nebo následné CR nebo velmi dobré parciální remisi. Separace kmenových buněk byly doplněny in vitro purgingem pomocí anti-CD20 monoklonální protilátky s komplementem. Přípravným režimem před autologní transplantací byl vysokodávkovaný cyklofosfamid a celotělové ozáření (TBI). Při sledování MRN po transplantaci bylo v multivariantní analýze prokázáno, že PCR negativita Bcl-2/IgH byla spojena se signifikantně nižším rizikem relapsu ($p<0.001$) a smrti ($p=0.02$) ve srovnáním se skupinou s přetrvávající PCR pozitivitou. Na druhou stranu relativně vysoké riziko sekundárních MDS či AML (12 %) je poměrně alarmující (163, 177).

V jiné práci autoři sledovali pomocí nested a kvantitativní real-time PCR t(14;18) v periferní krvi 15 nemocných před a po ASCT – jednalo se o nemocné v 1.nebo následující CR. U 9 z nich detekovali Bcl-2/IgH přestavbu. Po ASCT došlo k dosažení molekulárně genetické remise u 5/7 nemocných. Během následujících 2 let došlo k molekulárnímu relapsu u všech nemocných, přičemž byl zaznamenán dvojí průběh: u jednoho nemocného byl zaznamenán logaritmický nárůst t(14;18) pozitivních buněk, u druhého pak byl přítomen velmi pozvolný (85). Gribben a kol. ve své práci rovněž prokázali, že přítomnost nebo znovuobjevení t(14;18) pozitivních buněk v kostní dřeni po autologní transplantaci je spojeno s vyšším rizikem relapsu onemocnění (138)

Ladetto a spoluautoři prezentovali v roce 2002 výsledky léčby 92 nemocných s FL, kdy ASCT byla použita jako konsolidace intenzivního sekvenčního protokolu u pacientů v 1.linii léčby. Jednalo se o multicentrickou studii, která měla potvrdit slibné výsledky dosažené stejným protokolem v rámci 1 centra (179). Celkem 81 nemocných (88 %) dosáhlo CR, z toho 49 po vysokodávkovaném sekvenčním protokolu a 32 po ASCT. V rámci molekulárně genetické studie bylo zjištěno, že po sekvenčním protokolu bylo 47 % štěpů kmenových buněk PCR negativních stran průkazu t(14;18) a po ASCT dosáhlo molekulárně genetické remise 65 % pacientů. Tato skupina měla extrémně nízké riziko relapsu onemocnění (12 %) oproti skupině PCR pozitivních (77 %), což se promítlo ve významně lepším obdobím bez známek nemoci (DFS) u molekulárně geneticky negativní skupiny ($p<0.001$). Závěry této multicentrické studie tedy potvrdily výsledky publikované z unicentrické studie, včetně obdobných molekulárně genetických nálezů. Některé studie dokonce poukazují na skutečnost, že jedinci t(14;18) negativní po ASCT mají nejen delší období bez progrese lymfomu, ale i lepší celkové přežití oproti skupině t(14;18) pozitivních (180). Z českých autorů prezentovali zajímavé výsledky olomoučtí autoři, kteří prokázali rovněž 80 % efektivitu ASCT stran schopnosti konverze PCR pozitivity t(14;18) do negativity (66).

Jaké je tedy postavení autologní transplantace u FL, zejména ve světle vysokého procenta dosažených molekulárně genetických remisí? Odpověď na tuto otázku je stále nejasná, zejména v době monoklonálních protilátek, a to zejména z důvodu relativně vysoké toxicity léčby.

2.12.3. Molekulární remise a purging

S autologními transplantacemi úzce souvisí problematika tzv."purgingu", tedy čištění štěpu od kontaminace lymfomovými elementy. Mnoho studií se zabývalo otázkou, zda infúze štěpu kontaminovaného lymfomovými buňkami zvyšuje riziko následného relapsu. Několik prací tuto hypotézu potvrzuje (182, 183). Otázkou ale je: pokud podáme štěp kontaminovaný lymfomovými buňkami, mělo by dojít k systémovému relapsu onemocnění – přesto většina nemocných relabuje v místech původního postižení. Nabízí se možné vysvětlení, které spočívá v tzv, homingovém mechanismu, kdy lymfomové buňky putují na základě imunologických mechanismů do původně postižených uzlin (183).

Z technického hlediska existují 2 způsoby čištění štěpu kmenových buněk od nádorových elementů – in vitro a in vivo purging. Vyvinutí ex vivo (= in vitro) purgingu

představovalo velkou naději ve výzkumu ASCT u nehodgkinových lymfomů (184). Apostolidis a kol. ve své práci prezentovali výsledky in vitro purgingu pomocí anti-CD20 monoklonlní protilátky a komplementu, který prováděli u nemocných s FL před autologní transplantací. V cca 30 % případů došlo k vymizení Bcl-2/IgH pozitivních buněk ze štěpu po použití této metody (163). Použití čištěného štěpu ale nemělo vliv na zlepšení prognózy nemocných, čímž se potvrdily výsledky jiných autorů (182, 185). Navíc in vitro purging má několik nevýhod: je technicky a laboratorně náročný, z hematologického hlediska některé práce popisují prodloužení přihojení štěpu po ASCT a v neposlední řadě zvyšuje i náklady na léčbu (186).

Úspěšný in vivo purging v době před zavedením monoklonálních protilátek, tedy po podání samotné chemoterapie, byl popsán několika autory. Po podání intenzivního sekvenčního protokolu bylo dosaženo ve 47 % případů PCR negativity štěpu při průkazu Bcl-2/IgH přestavby (187). Podobné, i když ne tak úspěšné výsledky prezentoval i Corradini (139). Zavedení monoklonální protilátky anti-CD20, rituximabu, do léčby nehodgkinových lymfomů přineslo příznivé výsledky v oblasti in vivo purgingu. V práci Magniho a kol. (189) bylo na souboru 15 nemocných s FL a mantle cell lymfomem, u nichž byl podán rituximab v kombinaci s chemoterapií v rámci in vivo purgingu, dosaženo 93 % molekulárně genetické remise ve štěpu, což bylo signifikantně více než v obdobné skupině bez rituximabu (40 %, p=0.007). Slovenští autoři prezentovali efektivitu in vivo purgingu rituximabem u souboru 27 nemocných s indolentními lymfomy. Po ASCT bylo ve skupině s podaným rituximabem 100 % klinických remisí, včetně 79 % molekulárně genetických remisí, což bylo statisticky více oproti kontrolní skupině bez rituximabu ($p<0.01$) (189).

Lze tedy shrnout: in vivo purging v době monoklonálních protilátek zcela jednoznačně nahrazuje dříve používané in vitro metody, a to jednak z důvodu menší technické a laboratorní náročnosti, ale zejména pro svoji vyšší efektivitu na odstranění reziduálních lymfomových buněk ve štěpu. Obecně ale stále není zcela jasné, zda čištění štěpu přispěje ke zlepšení výsledků léčby stran celkového přežití.

2.12.4. Molekulární remise a alogenní transplantace

Alogenní transplantace je u folikulárních lymfomů indikací zatím spíše okrajovou, ale do budoucnosti nadějnou. Je to z toho důvodu, že přirozený průběh onemocnění je indolentní a alogenní transplantace s myeloablativní přípravou byly spojeny s vysokou peritransplantační mortalitou (TRM). Na druhou stranu pro mladé nemocné s prognosticky nepříznivými

charakteristikami je to metoda, kterou musíme zvažovat. Navíc v poslední době se začínají u nemocných s folikulárními lymfomy uplatňovat alogenní transplantace po nemyeloablativním přípravném režimu, které jsou spojeny s výrazně nižší peritransplantační mortalitou. Na druhou stranu, několik studií ukazuje, že riziko relapsu je po alogenní transplantaci cca poloviční oproti autologní transplantaci – jedná se ale většinou o retrospektivní porovnání dat z registrů, nikoliv randomizované studie (190). V jedné z mála prospektivních studii amerických autorů se potvrdil význam alogenní transplantace oproti autologní transplantaci stran nižšího rizika relapsu onemocnění, ale doba do progrese byla bez rozdílu mezi oběma skupinami (191). Přesto někteří pacienti z alogenní transplantace profitují ve formě dlouhodobé remise (190, 192). Několik autorů se zabývalo otázkou molekulárně genetické remise u FL po alogenní transplantaci a jejího významu pro prognózu nemocných. V práci rakouských autorů byly prezentovány výsledky alogenní transplantace u souboru 35 nemocných s NHL (z nich u 9 se jednalo o folikulární lymfom). Ve všech případech se jednalo o prognosticky nepříznivé případy, 77 % mělo věkově upravený mezinárodní prognostický index (AA IPI) 2 a více. Molekulárně genetická studie u FL byla prováděna nested PCR u celkem 7 nemocných. Všichni dosáhli molekulární remise do 6 měsíců po transplantaci, 3 z nich jsou v dlouhodobé remisi, 3 zemřeli na TRM a u jednoho se objevil relaps 1 rok po transplantaci. Přestože se jednalo o výrazně předléčené nemocné, 93 % kompletních remisí představuje velice slibný výsledek – při pětiletém sledování bylo 40 % nemocných bez známek choroby (193). V práci Jucketta a kol.bylo 6/7 pacientů Bcl-2/IgH pozitivních po alogenní transplantaci s použitím T-buněčné deplece štěpu. Zatímco u 2 z nich se dostavil klinický relaps onemocnění, ostatní zůstávají v klinické remisi při mediánu sledování 5 let (192). Použití T-buněčné deplece může vysvětlit rozdíly mezi dosaženými molekulárně genetickými remisemi v obou výše uvedených studiích. Podobné výsledky stran dosažení molekulární remise po alogenní transplantaci u relabujících FL prezentoval i Masada a kol.(194). I přes skutečnost, že molekulárně genetickému sledování t(14;18) po alogenní transplantaci se nezabývá tolik prací, lze konstatovat, že většina autorů se shoduje, že eliminace t(14;18) pozitivních buněk je sdruženo s klinicky příznivějším průběhem onemocnění (103, 195).

2.12.5. Molekulární remise a rituximab

Monoklonální protilátka anti-CD20 byla vyvinuta jak pro diagnostické, tak i pro terapeutické účely (196). Rituximab je chimerická protilátka tvořená lidským

imunoglobulinem třídy IgG1 kappa s myšími variabilními oblastmi izolovanými z myší anti-CD20 monoklonální protilátky IDEC-2B8 (197). Jedná se o transmembránový protein, který funguje jako kalciový kanál a hraje důležitou roli v buněčné diferenciaci (196). Váže se na CD20 antigen na povrchu B-lymfocytů, včetně buněk lymfomových. CD20 antigen chybí na nezralých B-lymfocytech (pre-pre B), proto nedochází k jejich likvidaci (198). Počet zralých B-lymfocytů po léčbě rituximabem ale klesá. Podle studií na zvířatech B-buněčná deplece není rovnoměrná ve všech kompartmentech a klesá od periferní krve > kostní dřeň > uzliny. Podobný gradient můžeme sledovat i u lidí (199). Po léčbě naopak dochází k restituci normálních B-lymfocytů z těchto intaktních buněk, a proto nebyl pozorován u nemocných léčených rituximabem výraznější dlouhodobý protilátkový imunodeficit a častější výskyt infekcí.

Mechanismus působení rituximabu je komplexní. Ke zničení nádorové buňky dochází několika mechanismy:

a) buňkami zprostředkovanou cytotoxicitou (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity)
b) aktivací komplementu
c) indukcí apoptózy

Rituximab prokázal svoji klinickou efektivitu v léčbě nemocných s folikulárním lymfomem v rámci monoterapie v několika studiích. Léčebná odpověď se pohybovala v rámci monoterapie relapsu onemocnění mezi 46 % - 50 %, z toho většina remisí byla jen parciálních (146, 200). Trvání léčebné odpovědi se pohybovalo mezi 11-13 měsíci (146, 159). Rituximab prokázal efektivitu i v 8 týdenním schématu podávání (201), stejně jako při opakování léčby, kde nebyly výsledky léčby horší než v rámci léčby první linie (202). Podání rituximabu, chimerické monoklonální protilátky anti-CD20, vedlo u některých pacientů k dosažení molekulárně genetické remise, tedy konverze z PCR pozitivity do PCR negativity (203). Ve Foranově práci je prezentováno 62 % nemocných, kteří dosáhli po 4 dávkách rituximabu molekulárně genetické remise onemocnění – tato skutečnost ale nekorelovala s klinickou odpovědí (146). Příznivý efekt rituximabu na dosažení molekulární remise prezentovali i olomoučtí autoři (66).

Czuczman prezentoval v roce 2001 výsledky studie 70 nemocných s relabujícím folikulárním lymfomem, kteří byli léčeni rituximabem nebo kombinací R-CHOP (rituximab + cyklofosfamid, doxorubicin, vincristin, prednison). Molekulárně genetická analýza byla

prováděna ze vzorků periferní krve a kostní dřeně před a po léčbě pomocí PCR. Ve skupině léčené samotným rituximabem dosáhlo 36/70 t(14;18) negativity (51 %), u 13 pacientů přetrvávala pozitivita a 21 nemocných bylo kolísavě pozitivní/negativní. Celková léčebná odpověď byla ve zmíněných 3 skupinách 72 % vs. 31 % vs. 57 %.Ve skupině 18 pacientů léčených kombinací R-CHOP bylo 8 t(14;18) pozitivních před léčbou. 7 z nich dosáhlo po léčbě t(14;18) negativity (87.5 %), celková léčebná odpověď byla v této skupině 100 %. Hlavní rozdíl mezi oběma skupinami byl ten, že přestože nemocní, kteří byli léčeni samotným rituximabem, dosáhli v relativně vysokém procentu molekulární remise (51 %), většina z nich nebyla podle rozsahu uzlinových lézí v klinické remisi. Naopak všech 7 nemocných, kteří byli kombinační terapii R-CHOP t(14;18) negativní, dosáhli současně i kompletní regrese uzlinových lézí, lze tedy hovořit o molekulární kompletní remisi (204).

Rambaldi publikoval výsledky studie 128 nemocných s nově diagnostikovaným FL. Všichni nemocní byli v úvodu onemocnění t(14;18) pozitivní (90 % MBR, 10 % mcr). Po 6 cyklech chemoterapie CHOP byli ze studie vyřazeni nemocní, kteří dosáhli již po chemoterapii molekulární remise (36 %) a současně i pacienti, kteří na úvodní léčbu nereagovali. Zbývající skupině 79 t(14;18) pozitivním pacientům (39x CR, 40x PR) byly podány 4 dávky rituximabu 375mg/m^2 po týdnu k odstranění minimální residuální nemoci. Při kontrole po 12 týdnech došlo u 59 % ke konverzi do PCR negativity, přičemž při další kontrole po 28 týdnech bylo již 74 % t(14;18) negativních. Jedinci, kteří dosáhli molekulárně genetické remise, pak měli statisticky delší ($p<0.001$) období do návratu choroby (57 %) oproti skupině, která PCR negativity nedosáhla nebo ji ztratila (20 %) (164).

Ve studii francouzské skupiny prezentované Colombatem bylo léčeno 50 nemocných s nově diagnostikovaným FL s malou nádorovou masou léčeno 4 dávkami rituximabu ve standardním dávkování. Léčebná odpověď byla 73 % (z toho 20 % CR), což je výsledek lepší než v dříve prezentovaných studiích (146, 204), což může být způsobeno skutečností, že se jednalo o 1.linii léčby a navíc s velkou nádorovou masou nebyli do této studie zařazeni. V molekulárně genetické části studie bylo hodnoceno 32 nemocných s t(14;18) pozitivitou ve dřeni nebo periferní krvi. Z nich 57 % bylo 50 dní po terapii t(14;18) negativních v periferní krvi a 31 % v kostní dřeni. I zde se potvrzuje již dříve zmíněný gradient clearance lymfomových buněk (197). Dosažení molekulárně genetické remise v této studii jasně korelovalo s klinickou odpovědí. Podobné výsledky prezentovali i další autoři (146).

Celkově lze říci, že rituximab je velmi potentní lék stran dosažení molekulárně genetické remise u pacientů s FL. Jeho hlavní výhodou je minimální toxicita velmi dobrá tolerance, což z něho činí optimální lék pro kombinaci s chemoterapií. I přes výsledky několika studií

prokazující význam dosažení molekulárně genetické remise na klinický průběh onemocnění je v této oblasti stále mnoho otazníků, které byly zmíněny výše. I proto je zatím vyšetřování molekulárních markerů a MRN považováno stále za experimentální záležitost a v současné době z něj nevyplývají žádné zásadní konsekvence léčby. Nelze ale vyloučit, že do budoucna (zejména v éře udržovací léčby monoklonálními protilátkami) se tento přístup změní.

3. Experimentální část

3.1. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit výskyt Bcl-2/IgH pozitivity ve vzorcích periferní krve a kostní dřeně u nemocných s folikulárním lymfomem, a to pomocí nested PCR. K vyšetřování byly z technických důvodů vybrány dvě nejčastěji popisované varianty translokace t(14;18) dle zlomových míst: MBR (major breakpoint region) a mcr (minor cluster region). Současně byla sledována shoda záchytu pozitivity Bcl-2/IgH mezi oběma vyšetřovanými kompartmenty (kostní dřeň, periferní krev), shoda mezi molekulárně genetickým vyšetřením pomocí PCR a imunohistochemickým stanovením proteinu bcl-2 v trepanobioptických vzorcích kostní dřeně. Z klinického pohledu bylo hlavním úkolem práce stanovit, jaká část nemocných dosáhla molekulárně genetické remise onemocnění po jednotlivých liniích terapie, a zda se lišily mezi sebou výsledky léčby v dosažení molekulárně genetické remise u skupiny nemocných, které byly léčeny samotnou chemoterapií a chemoterapií v kombinaci s monoklonální protilátkou anti-CD20, rituximabem. Dalším cílem práce bylo porovnat 2 hlavní skupiny: nemocné s FL s prokázanou vstupní Bcl-2/IgH pozitivitou oproti skupině úvodem Bcl-2/IgH negativních. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda vstupní Bcl-2/IgH pozitivita ovlivňuje prognózu onemocnění.

3.2. Metodika

Do souboru byli zařazeni zejména nemocní s nově diagnostikovaným FL, u malé části se jednalo o relaps onemocnění (jen 7/50 nemocných). Před zahájením léčby byly od 41/50 nemocných k dispozici vzorky periferní krve i kostní dřeně, u 5 nemocných byl z technických důvodů vyšetřen jen vzorek periferní krve, u 4 nemocných jen vzorek kostní dřeně. Část souboru byla léčena samotnou chemoterapií (28/50), zbývající nemocní pak chemoterapií

v kombinaci s rituximabem. Volba mezi oběma způsoby léčby nebyla provedena pomocí randomizace – výběr typu léčby (s rituximabem nebo bez rituximabu) závisel zejména na období, ve kterém byl nemocný indikován k léčbě, neboť rituximab byl používán v rámci léčby 1.linie nemocných s folikulárním na našem pracovišti až od roku 2004. Z tohoto pohledu se jedná vlastně o porovnání 2 období – před zavedením rituximabu a po něm. U části souboru byl rituximab podáván jako konsolidační terapie po podání samotné chemoterapii. Jednalo se o podskupinu nemocných, kde samotnou chemoterapií nebylo dosaženo klinické remise onemocnění, a kde byl rituximab podán s cílem odstranit reziduální lymfomovou aktivitu.

V našem souboru byly následně porovnávány křivky celkového přežití (OS), přežití bez progrese (PFS) a přežití bez události (EFS) – a to u skupiny Bcl-2/IgH pozitivních vs.negativních po léčbě 1.linie i po ukončení celé terapie. U všech nemocných byly analyzovány následující klinické a laboratorní charakteristiky ve vztahu k průkazu Bcl-2/IgH přestavby: věk, pohlaví, performance status dle WHO klasifikace, B-symptomy, histologický grade lymfomu, hladina laktát dehydrogenázy, beta 2-mikroglobulin, klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace, mezinárodní prognostický index FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index), bulky disease > 5cm, extranodální léze (mimo dřeň) a postižení dřeně.

3.3. Soubor nemocných

Za období od června 2002 do ledna 2005 bylo na II.interní klinice, oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové, zařazeno do sledování 50 nemocných s folikulárním lymfomem. Všichni nemocní zařazení do sledování podepsali informovaný souhlas Diagnóza byla u všech případů stanovena histologickým vyšetřením lymfatické uzliny a ověřena druhým čtením. V souboru bylo 33 mužů a 17 žen, věkový medián byl 56,5 let (33-76). Vstupní klinické stádium I/II/III/IV dle Ann Arbor klasifikace bylo přítomno u 3/5/4/38 nemocných – většina tedy byla diagnostikována v pokročilém stadiu. Histologicky byl prokázán v lymfatické uzlině FL grade 1/2/3 u 17/26/6 pacientů, v 1 případě nebyl grade určen. Ve většině případů se jednalo o nově diagnostikované onemocnění (43 pacientů), u 7 nemocných pak o relaps FL. Vstupní prognostické skóre FLIPI - nízké/střední/vysoké riziko - bylo u 19/15/16 nemocných. B-symptomy (váhový úbytek, teploty neinfekčního původu nad 38 st. Celsia nebo profúzní noční poty) mělo 18 nemocných (36 %), vstupní performance status dle WHO 0/1/2 byl u 11/31/6 nemocných. 10 % pacientů mělo v době zařazení do sledování „bulky disease" (rozsáhlou lymfadenopatii >5cm). Zvýšená hodnota laktát

dehydrogenázy (LDH) byla zaznamenána u 29/50 pacientů, postižení kostní dřeně měla většina nemocných – 37 (74 %).

Hlavní klinické charakteristiky souboru jsou shrnuty v tab.1.

Tabulka 1. Hlavní klinické charakteristiky celého souboru před léčbou (n=50).

	Počet pacientů, n=50	%
Pohlaví		
Muži	33	67
Ženy	17	33
Věk ≥ 65 let	12	24
Grade lymfomu		
1+2	43	86
Stádium lymfomu		
I	3	6
II	5	10
III	4	8
IV	38	76
B-symptomy	18	36
Performance status		
0-1	42	84
2-3	8	16
LDH > norma	29	58
Beta 2 mikroglobulin > norma	26	52
Masa lymfomu > 5cm	5	10
Extranodální postižení (mimo dřeň)	10	20
Postižení dřeně	37	74
FLIPI		
0-1 (nízké riziko)	19	38
2 (střední riziko)	15	30
3-5 (vysoké riziko)	16	32

3.4. Léčba

Nemocní byli nejčastěji léčeni v té době standardní chemoterapií CHOP (cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) – ve 23 případech, u ostatních nemocných byly použity následující režimy: 9x R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicine, vinkristin, prednison), 8x R-COP (rituximab, cyklofosfamid, vinkristin, prednison), 5x R-FND (rituximab, fludarabin, mitoxantron, dexamethason) a 5x COP (cyklofosfamid, vinkristin, prednison). Složení chemoterapií je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2. Schéma použitých chemoterapeutických režimů.

(R) - CHOP: (rituximab 375 mg/m^2) IV D1, cyklofofamid 750 mg/m^2 IV D 1, doxorubicin 50 mg/m^2 IV D 1, vinkristin 1,4 mg/m^2 IV D 1 (maximum 2 mg), prednison 100 mg PO D 1-5
(R) - COP: (rituximab 375 mg/m^2) IV D1, cyklofosfamid 750 mg/m^2 IV D 1, vinkristin 1,4 mg/m^2 IV D 1 (maximum 2 mg), prednison 40 mg/m^2 PO D 1-5
R - FND: rituximab 375 mg/m^2 IV D1, fludarabin 25 mg/m^2 IV D1-3, mitoxantron 10 mg/m^2 IV D 1, dexamethason 20 mg PO D 1-5

Monoklonální protilátka anti CD20 – rituximab – byla podána v rámci imunochemoterapie v první linii léčby u 22 pacientů (44 %), ostatních 28 nemocných bylo léčeno samotnou chemoterapií. U 17/27 (52 %) nemocných, kteří byli léčeni samotnou chemoterapií (1 nemocný nehodnocen, zemřel při léčbě), ale kde nebylo dosaženo klinicky kompletní remise onemocnění, byl podán sekvenčně rituximab 4 x 375 mg/m^2 v týdenních intervalech s cílem odstranění reziduální nemoci. Charakteristika této podskupiny je v tab.3.

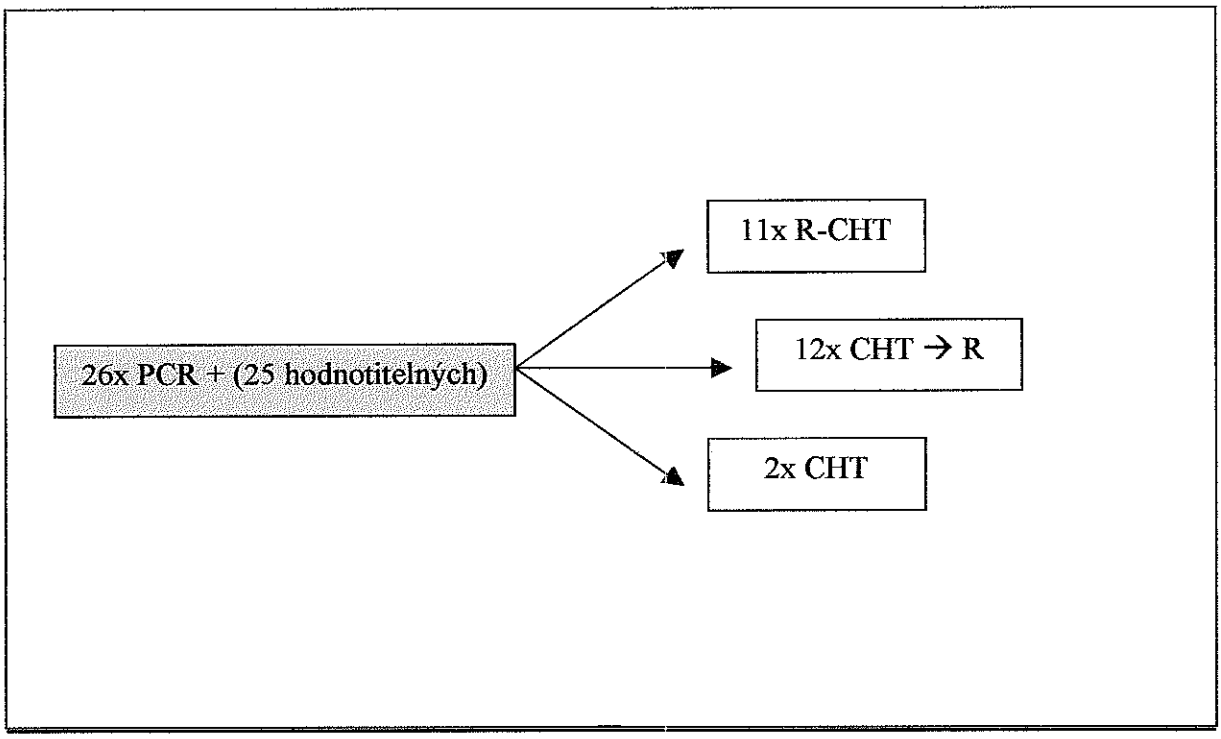
Tabulka 3. Charakteristika 17 nemocných indikovaných k sekvenčnímu podání rituximabu.

N=17	Počet pacientů	%
Pohlaví		
Muži	11	65
Věk > 65 let	4	24
Grade lymfomu		
1+2	17	100
Stadium		
III+IV	16	94
B-symptomy	8	47
Performance status		
0-1	15	88
LDH > normu	8	47
Beta 2 mikroglobulin > normu	14	82
Masa lymfomu > 5cm	1	6
Postižení dřeně	15	88
FLIPI		
0-1 (nízké riziko)	4	24
2 (střední riziko)	6	35
3-5 (vysoké riziko)	7	41

Molekulárně genetická odpověď na léčbu byla hodnocena u 25 nemocných (1 zemřel při léčbě). U všech vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných byly vyšetřeny vzorky periferní krve i kostní dřeně před léčbou i po jejím skončení. U 12/17 (71 %) nemocných, kde byl rituximab podán sekvenčně po samotné chemoterapii, byla vstupně zjištěna Bcl-2/IgH pozitivita. U této podskupiny bylo sledováno, zda po podání rituximabu došlo k vymizení Bcl-2/IgH pozitivity a při jejím přetrvávání bylo vyšetření opakováno ještě po 3 a 6 měsících. U nemocných v molekulárně genetické remisi bylo hodnoceno, zda dosažení remise ovlivnilo prognózu onemocnění ve vztahu k delšímu celkovému přežití, přežití bez známek progrese a

přežití bez události oproti skupině, kde nebylo Bcl-2/IgH negativity dosaženo. Klinicky byla léčebná odpověď hodnocena dle standardních Chesonových kriterií (205). Přehledně je způsob léčby nemocných ve skupině PCR vstupně pozitivních uveden na obr.1

Obrázek 1. Způsob léčby u podskupiny vstupně bcl-2/IgH pozitivních (n=25).



3.5. DNA extrakce a analýza

DNA ze vzorků periferní krve a kostní dřeně byla extrahována fenol-chloroformovou extrakcí po inkubaci 200 µl vzorku s proteinázou K při 56°C po dobu 16 hodin nebo pomocí komerčních mikrokolonek (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, SRN) dle doporučení výrobce. Pro amplifikaci byla použita dvoukolová nested PCR. Produkty definované pomocí systému zevních a vnitřních primerů zahrnovaly oblasti major breakpoint region (MBR) a minor cluster region (mcr) na chromozómu 18. Sekvence primerů byly převzaty z práce Gribbena a kol. (60). Obě PCR reakce byly provedeny v 25 µl reakční směsi obsahující: 150 ng nebo 500 ng DNA (v PCR I reakci) nebo 1µl PCR I produktu (PCR II reakce), 2,5 µl 10x PCR pufru (TaKaRa Schuzo, Otsu, Shiga, Japonsko), 200 µM koncentraci každého dNTP (TaKaRa), 0.8 µM koncentraci primerů, 2 mM chloridu hořečnatého a 1U Taq polymerázy (TaKaRa). Amplifikace byla provedena v termocykléru GeneAmp PCR System 9600 (Perkin

Elmer, Norwalk, USA). Po úvodní denaturaci (5 min při 96°C) proběhly PCR I and PCR II reakce v 30 reakčních cyklech: 60 sekund denaturace při 95 °C, 60 sekund annealing při 60°C a 60 sekund polymerace při 72°C. Detekce PCR produktů byla provedena pomocí elektroforézy na 2 % agarózovém gelu s ethidiumbromidem. Pro vyloučení falešné pozitivity bylo vyšetření provedeno paralerně i metodou extrakčních mikrokolonek se shodnými výsledky.

4. Statistická analýza

Základními sledovanými parametry našeho souboru byly: léčebná odpověď – tedy procento dosažení kompletní remise, parciální remise nebo stabilního onemocnění, dále molekulárně genetická remise v kostní dřeni a/nebo v periferní krvi. Celý soubor byl vyhodnocen pomocí následujících parametrů: celkové přežití, které bylo definováno jako období od zahájení terapie do úmrtí nemocného nebo ztráty ze sledování, období do progrese, které bylo určeno jako doba od zahájení léčby do relapsu/progrese onemocnění. Za událost byla považována progrese/relaps lymfomu, zahájení další protinádorové léčby nebo úmrtí z jakékoliv příčiny. K porovnání shody vstupních charakteristik souboru nemocných bylo použito Fisherova přesného testu, křivky přežití byly vytvořeny dle metody Kaplana a Meiera (206), shoda křivek byla testována log rank testem. Klinicky byla léčebná odpověď hodnocena dle standardních Chesonových kriterií (205). Z molekulárně genetického hlediska byla dvoukolová nested PCR schopna detekce 1 nádorové buňky z 10^5 molekul zdravých. Pro spolehlivost metody bylo vyšetření provedeno paralerně 2 metodami – fenol/chloroformovou extrakcí i metodou extrakčních mikrokolonek, jak bylo popsáno v kapitole 3.5.

5. Výsledky

5.1. Stanovení Bcl-2/IgH a jejího typu před léčbou

Před zahájením léčby bylo analyzováno 91 vzorků: 46 z periferní krve a 45 z kostní dřeně. Od 41 nemocných byly k dispozici vzorky z obou výše uvedených kompartmentů, u 5 nemocných byl vyšetřen jen vzorek periferní krve, u 4 nemocných jen vzorek kostní dřeně. Bcl-2/IgH pozitivita z periferní krve a/nebo kostní dřeně byla nalezena u 26/50 nemocných (52 %), u zbývajících 24 nemocných (48 %) nebyla Bcl-2/IgH přestavba pomocí nested PCR zachycena. Medián věku u skupiny vstupně PCR pozitivních nemocných byl 56,5 let (35-74 let), u skupiny vstupně PCR negativní také 56,5 let (33-76 let). Hlavní klinické a laboratorní charakteristiky obou podskupin (vstupně Bcl-2/IgH pozitivní vs.Bcl-2/IgH negativní) a jejich porovnání ukazuje tab.4. Z ní je patrné, že obě podskupiny se statisticky významně lišily jen ve věku a v pravděpodobnosti postižení kostní dřeně před zahájením léčby – věk do 65 let a častější postižení dřeně byly shledány u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních. Přítomnost Bcl-2/IgH přestavby vstupně nebyla dle našeho sledování asociována s gradingem lymfomu, přítomností B-symptomů ani dalšími klinickými charakteristikami. Z 26 nemocných Bcl-2/IgH pozitivních před léčbou se ve 24 případech (92 %) jednalo o přestavbu MBR, u 2 p (8 %) pak byla prokázána přestavba ve zlomovém místě mcr. U 23 ze 26 vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných bylo diagnostikováno postižení obou kompartmentů současně (ve 21 případech MBR, u 2 nemocných mcr). U dvou pacientů byla Bcl-2/IgH pozitivita kostní dřeně při negativitě Bcl-2/IgH v periferní krvi, u jednoho nemocného naopak byl záchyt Bcl-2/IgH elementů jen v periferní krvi při negativním nálezu v kostní dřeni.

Tabulka 4. Klinické a laboratorní charakteristiky souboru nemocných ve vztahu k přítomnosti Bcl-2/IgH přestavby před léčbou.

	vstupně Bcl-2/IgH negativní, n = 24 (%)	vstupně Bcl-2/IgH pozitivní, n = 26 (%)	P - hodnota
Mužské pohlaví	33	61	NS
Věk < 65 let	58	88	**0.02**
Grade FL			
I+II	80	81	NS
III	17	19	NS
Stádium			
I+II	25	8	NS
III+IV	75	92	NS
B-symptomy	42	30	NS
Performance status			
0-1	79	88	
2 a více	21	12	NS
LDH > norma	63	54	NS
Beta 2 mikroglobulin > norma	48	69	NS
Bulk > 5cm	13	12	Ns
Extranodální postižení (mimo dřeň)	29	12	NS
Postižení dřeně	58	88	**0.02**
FLIPI			
0-1 (nízké riziko)	50	27	NS
2 (střední riziko)	25	35	NS
3-5 (vysoké riziko)	25	38	NS

Tabulka 5. Léčebné charakteristiky souboru nemocných ve vztahu k přítomnosti Bcl-2/IgH přestavby před léčbou.

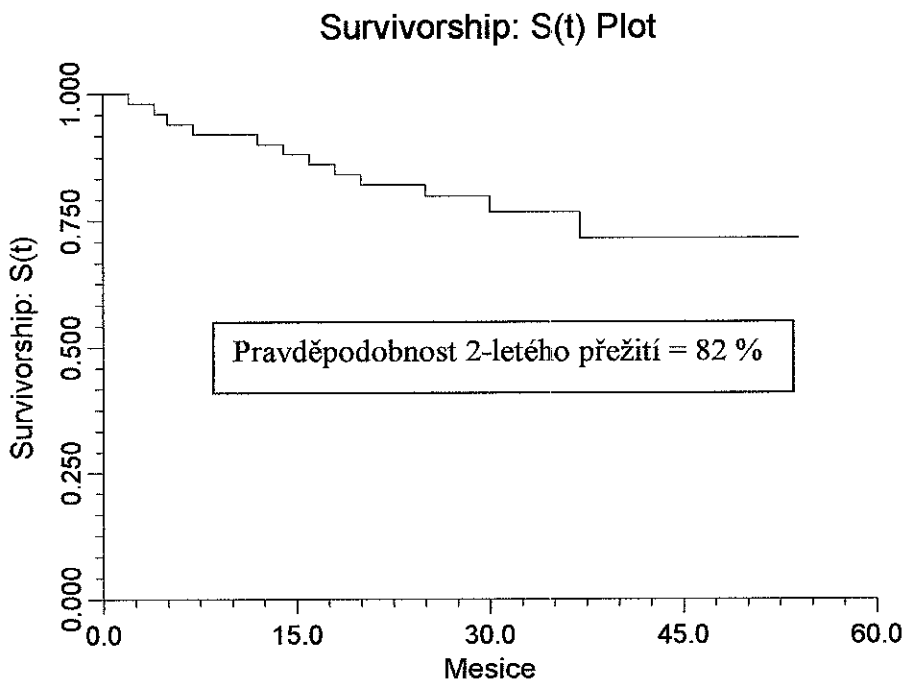
	vstupně Bcl-2/IgH negativní, n = 24 (%)	vstupně Bcl-2/IgH pozitivní, n = 26 (%)	P - hodnota
Dosažení uCR + CR	57	53	NS
Radioterapie	17	15	NS
Rituximab v léčbě	46	42	NS
Režimy podané léčby			
CHOP	42	50	NS
R-CHOP	16	19	NS
R-COP	13	19	NS
COP	16	4	NS
R-FND	13	8	NS
Radioterapie	17	15	NS
Relaps/progrese	25	50	NS
Žijící nemocní	71	81	NS
Délka sledování (medián, měsíce)	28.5	34	NS

5.2. Význam vstupní Bcl-2/IgH pozitivity na výsledky léčby a prognózu

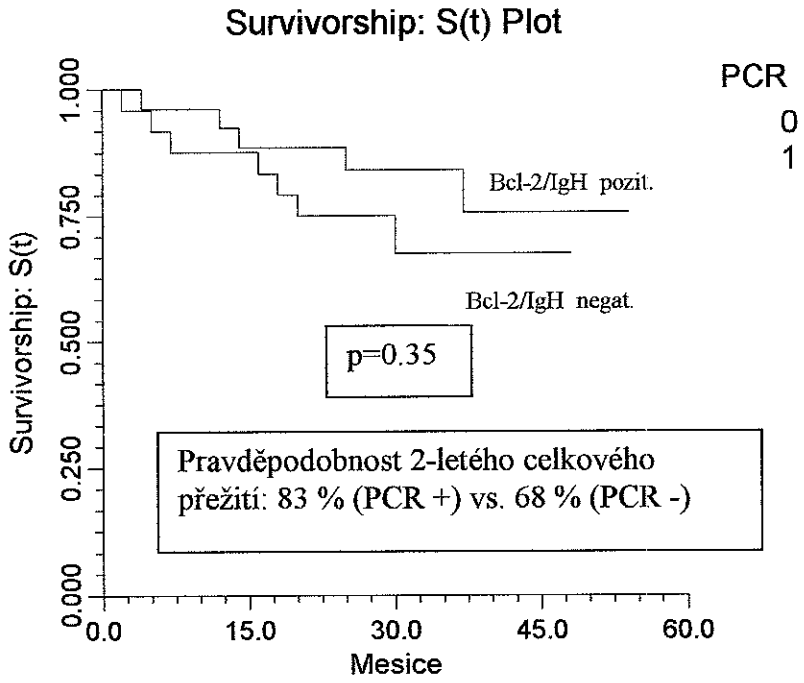
V této části studie bylo zkoumáno, zda nemocní s prokázanou vstupní Bcl-2/IgH pozitivitou folikulárního lymfomu měli odlišnou klinickou a molekulárně genetickou odpověď na léčbu oproti skupině vstupně Bcl-2/IgH negativních. U celého souboru 50 pacientů byla klinicky zaznamenána léčebná odpověď u 40/50 nemocných (80 %). Ve 22 případech (44 %) bylo dosaženo nejisté kompletní remise (uCR) a kompletní remise (CR), u 18 nemocných (36 %) byla dosažena parciální remise (PR). Nebyl shledán žádný statisticky významný rozdíl v celkové léčebné odpovědi (uCR+CR+PR) mezi skupinou vstupně Bcl-2/IgH pozitivních a vstupně Bcl-2/IgH negativních nemocných (85 % vs. 86 %, p=NS). Obě podskupiny se ale lišily v pravděpodobnosti následného relapsu/progrese. Tyto události byly

zaznamenány u 15/25 (60 %) vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných s mediánem doby do relapsu/progrese 16 měsíců, ale jen u 5/20 (25 %) vstupně Bcl-2/IgH negativních nemocných (u 4 nemocných nebyl hodnocen pro tento parametr, neboť došlo k úmrtí během léčby) s mediánem doby do relapsu/progrese 14 měsíců. Tento rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky významný (p=0.03). Pravděpodobnost 2-letého celkového přežití u celého souboru byla 82 % (viz obr.2). U podskupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních byla pravděpodobnost 2-letého celkového přežití 83 %, u vstupně Bcl-2/IgH negativních pak 68 %, tento rozdíl nebyl statisticky významný (p=0,35) – viz obr.3.

Obrázek 2. Graf celkového přežití celého souboru – medián přežití nebyl dosažen, třetí kvartil byl 37 měsíců.

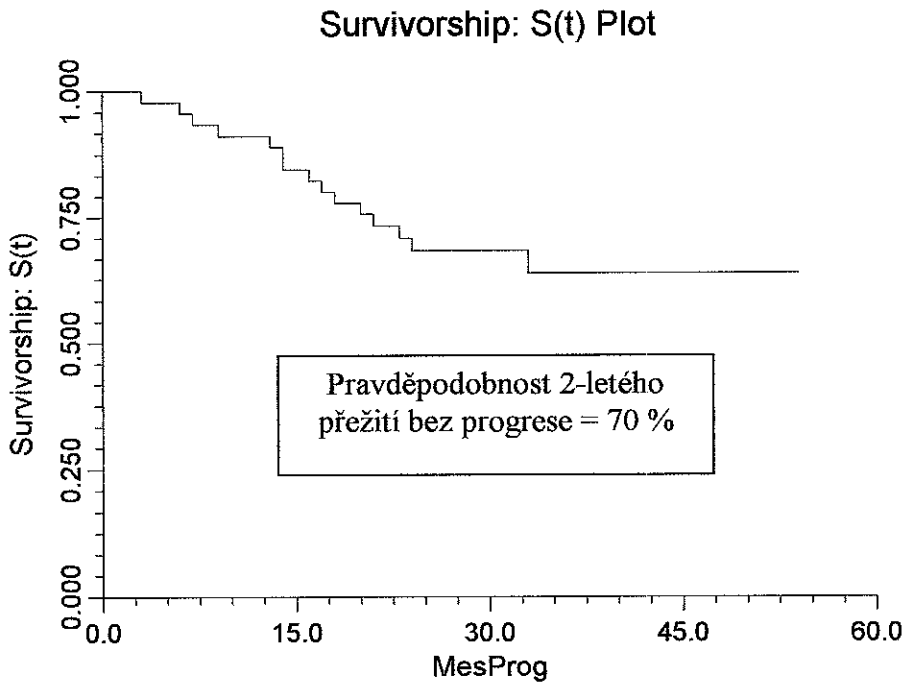


Obrázek 3. Kaplan – Meierovy křivky celkového přežití u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních (červeně) a Bcl-2/IgH negativních nemocných.

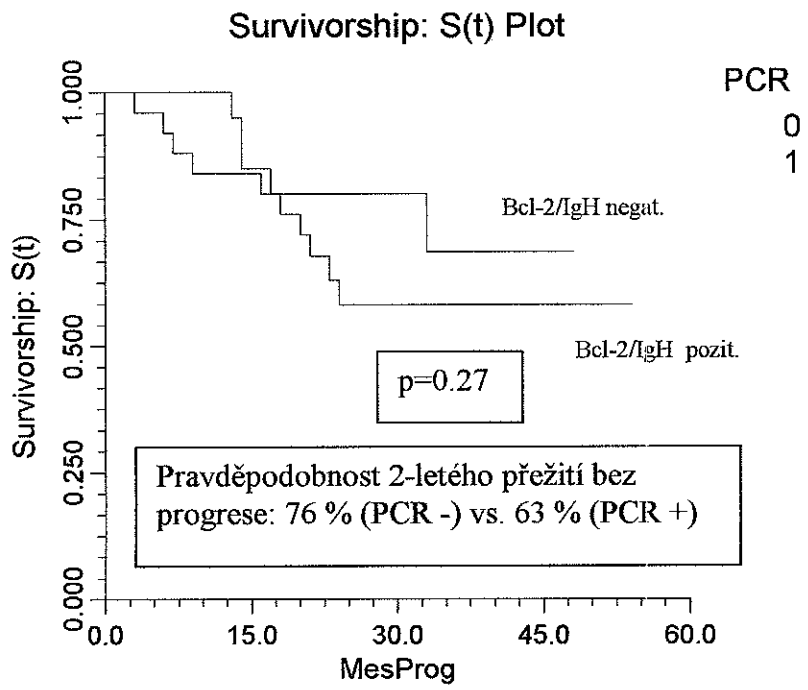


Dalším hodnoceným parametrem byla doba do progrese. Pravděpodobnost 2-letého přežití bez progrese byla celkově 70 % (obr.4), u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních 63 %, u Bcl-2/IgH negativních 75 % (p=0,27) – viz obr.5.

Obrázek 4. Graf období do progrese u celého souboru. Medián doby do relapsu/progrese (PFS) celého souboru zatím nebyl dosažen, třetí kvartil byl 20 měsíců.

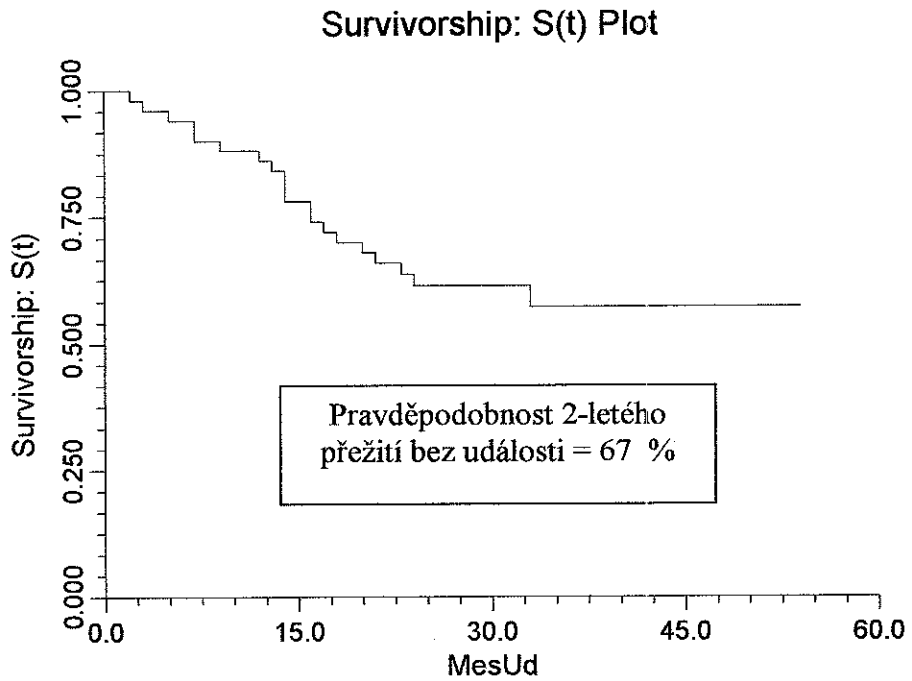


Obrázek 5. Porovnání křivek doby do progrese u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních (červeně) a Bcl-2/IgH negativních nemocných.

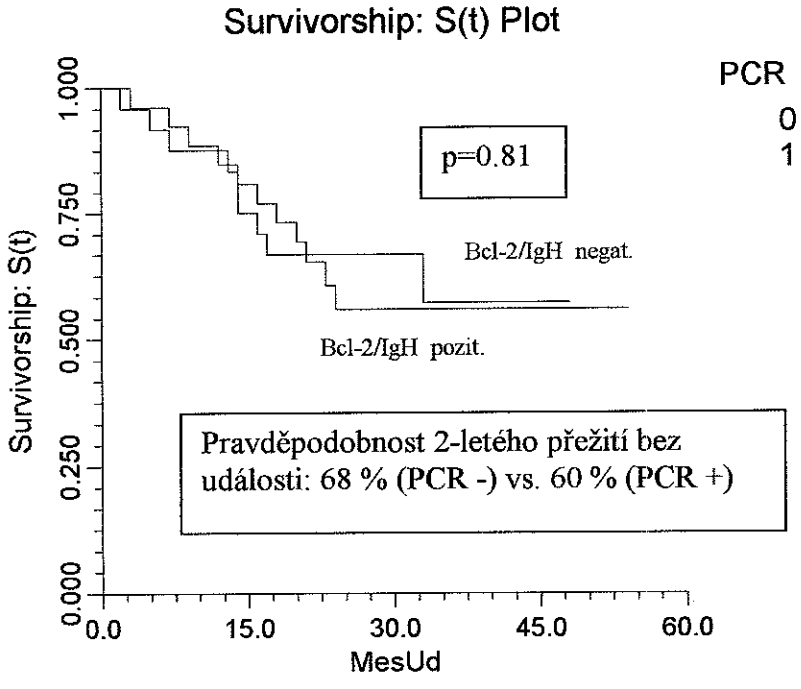


Pravděpodobnost 2-letého přežití bez události byla u celé skupiny 67 % (obr.6), u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních 60 % vs. 68 % u podskupiny vstupně Bcl-2/IgH negativních – ani tento rozdíl nebyl statisticky významný (p=0.81) – viz obr.7.

Obrázek 6. Graf období do události u celého souboru. Medián doby do události u celého souboru nebyl dosažen, třetí kvartil byl 17 měsíců.



Obrázek 7. Porovnání křivek doby do události u skupiny vstupně Bcl-2/IgH pozitivních (červeně) a Bcl-2/IgH negativních nemocných (modře).



K datu hodnocení žije 38/50 nemocných (76 %), ve skupině vstupně Bcl-2/IgH pozitivních je to 21/26 pacientů (81 %), ve skupině Bcl-2/IgH negativních žije 17/24 (71 %). Tento rozdíl není statisticky významný. Medián sledování celého souboru je 29,5 měsíců (2-54).

5.3. Klinická a molekulární odpověď po indukční léčbě chemoterapií a imunochemoterapie

Ve skupině 50 nemocných zařazených do sledování byla zjištěna Bcl-2/IgH pozitivita z periferní krve a/nebo kostní dřeně pomocí nested PCR u 26 pacientů (52 %), zbývajících 24 nemocných (48 %) bylo Bcl-2/IgH negativních. Z 26 nemocných Bcl-2/IgH pozitivních před léčbou se ve 24 případech (92 %) jednalo o přestavbu v oblasti major breakpoint region (MBR), u 2 pacientů (8 %) pak v oblasti minor cluster region (mcr).

28 pacientů bylo léčeno samotnou chemoterapií (CHT), 22 chemoterapií v kombinaci s rituximabem (R-CHT). Z 28 nemocných po podání CHT bylo 25 hodnotitelných (3 nemocní zemřeli během léčby), u 21 z nich byla zaznamenána klinicky léčebná odpověď (84 %),

z toho u 7 nejistá kompletní remise (uCR) a kompletní remise (CR) - 28 %, u 14 pak parciální remise (PR) - 56 %. Čtyři nemocní hodnoceni jako stabilní onemocnění (SD).

Ze molekulárně genetického pohledu ze 14 vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných z této podskupiny léčených samotnou CHT dosáhli vymizení Bcl-2/IgH přestavby po CHT jen 2 nemocní (14 %), v 1 případě se jednalo o pacienta v CR, u 1 v parciální remisi.

Ze 22 nemocných léčených kombinací rituximabu a chemoterapie (R-CHT) bylo 21 klinicky hodnotitelných (1 nemocný zemřel při léčbě). Z klinického pohledu dosáhlo CR + uCR celkem 15/21 pacientů (71 %), u 4 bylo dosaženo PR (19 %), 2 nemocní hodnoceni jako SD. Celková klinická léčebná odpověď (tedy uCR + CR + PR) v této skupině byla 90 %.

Z molekulárního hlediska ze skupiny 11 pacientů léčených R-CHT, a vstupně Bcl-2/IgH pozitivních, dosáhlo po léčbě celkem 7 molekulární remise (64 %) - 6 z nich bylo klinicky v uCR + CR, jeden v PR. Porovnáním obou skupin bylo zjištěno, že nemocní léčení R-CHT dosáhli statisticky významně více molekulárních remisí než pacienti léčení samotnou CHT (64 % vs. 14 %, p=0,037).

Z klinického pohledu nemocní po R-CHT dosáhli významně vyššího procenta uCR + CR oproti skupině léčené samotnou CHT (71% vs.28 %, p=0,007). Výsledky klinické a molekulární odpovědi skupiny léčené CHT i R-CHT jsou shrnuty v tab.6.

Tabulka 6. Klinická a molekulární odpověď po chemoterapii (CHT) a chemoterapii s rituximabem (R-CHT).

Klinická odpověď	N	%	před léčbou	po léčbě	po léčbě
			PCR +	PCR +	PCR -
po podání CHT:	25		N=14		
uCR + CR	7	**28**		2/3	1/3
PR	14	56		8/9	1/9
SD	4	16		2/2	0/2
CELKEM				12/14	**2/14 (14 %)**
po podání R-CHT:	21		N=11		
uCR + CR	15	**71**		2/8	6/8
PR	4	19		½	1/2
SD	2	10		1/1	0/1
CELKEM				4/11	**7/11 (64 %)**

Podrobnější analýzou bylo zjištěno, že vyšší pravděpodobnosti dosažení klinické odpovědi ve smyslu uCR+CR bylo dosaženo u pacientů s grade 3 folikulárního lymfomu, u jedinců bez B symptomů a u pacientů, kteří byli léčeni v léčbě 1.linie rituximabem – viz tabulka 7.

Tabulka 7. Pravděpodobnost dosažení uCR + CR po 1.linii léčby ve vztahu ke vstupním charakteristikám (n=47).

Parametr		uCR+ CR n=47 (%)		uCR + CR n=47 (%)	P
Věk	< 65 let	50	≥ 65 let	36	NS
Pohlaví	Muži	45	ženy	50	NS
Grade FL	**1+2**	**38**	**3**	**100**	**0.005**
Linie léčby	První	46	relaps	50	NS
Stadium	I+II	71	III+IV	43	0.23
B-symptomy	**ano**	**18**	**ne**	**63**	**0.005**
PS	0+1	48	2-5	33	NS
LDH	N	37	N	54	NS
Beta 2 mikroglobulin	> N	61	> N	38	NS
FLIPI	0-1	59	2-5	40	NS
Extranodální léze	ano	70	ne	42	NS
Postižení dřeně	ano	40	ne	67	NS
Radioterapie	ano	50	ne	46	NS
Podání rituximabu	**ano**	**68**	**ne**	**28**	**0.009**
PCR stav před léčbou	+	42	-	52	NS

Z molekulárně genetického pohledu na stejný problém bylo zjištěno, že pouze podání rituximabu v 1.linii statisticky významně ovlivnilo dosažení molekulárně genetické remise. Všechny ostatní parametry v našem souboru nebyly statisticky významně spojeny s vymizením Bcl-2/IgH přestavby po léčbě 1.linie. – viz tab.8

Tabulka 8. Pravděpodobnost dosažení Bcl-2/IgH negativity po 1.linii léčby ve vztahu ke vstupním charakteristikám (n=25).

Parametr		Bcl-2/IgH negat. n=25 (%)		Bcl-2/IgH negat . n=25 (%)	P
Věk	< 65 let	45	≥ 65 let	0	NS
Pohlaví	Muži	44	ženy	22	NS
Grade FL	1+2	30	3	100	NS
Linie léčby	první	36	relaps	33	NS
Stadium	I+II	50	III+IV	35	NS
B-symptomy	ano	13	ne	47	NS
PS	0+1	41	2-5	0	NS
LDH	N	50	> N	23	NS
Beta 2mikroglobulin	N	63	> N	27	NS
FLIPI	0-1	57	2-5	28	NS
Extranodální léze	ano	67	ne	32	NS
Postižení dřeně	ano	36	ne	33	NS
Podání rituximabu	**ano**	**64**	**ne**	**14**	**0.01**

5.4. Klinická a molekulární odpověď na sekvenční podání rituximabu po chemoterapii

Sekvenčně byl podán rituximab u 17 z 27 nemocných, kteří byli léčeni samotnou chemoterapií, ale u kterých nebylo dosaženo kompletní remise onemocnění s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou. Z klinického pohledu bylo před podáním rituximabu ze 17 nemocných 14 v parciální remisi a 3 v nejisté kompletní remisi.

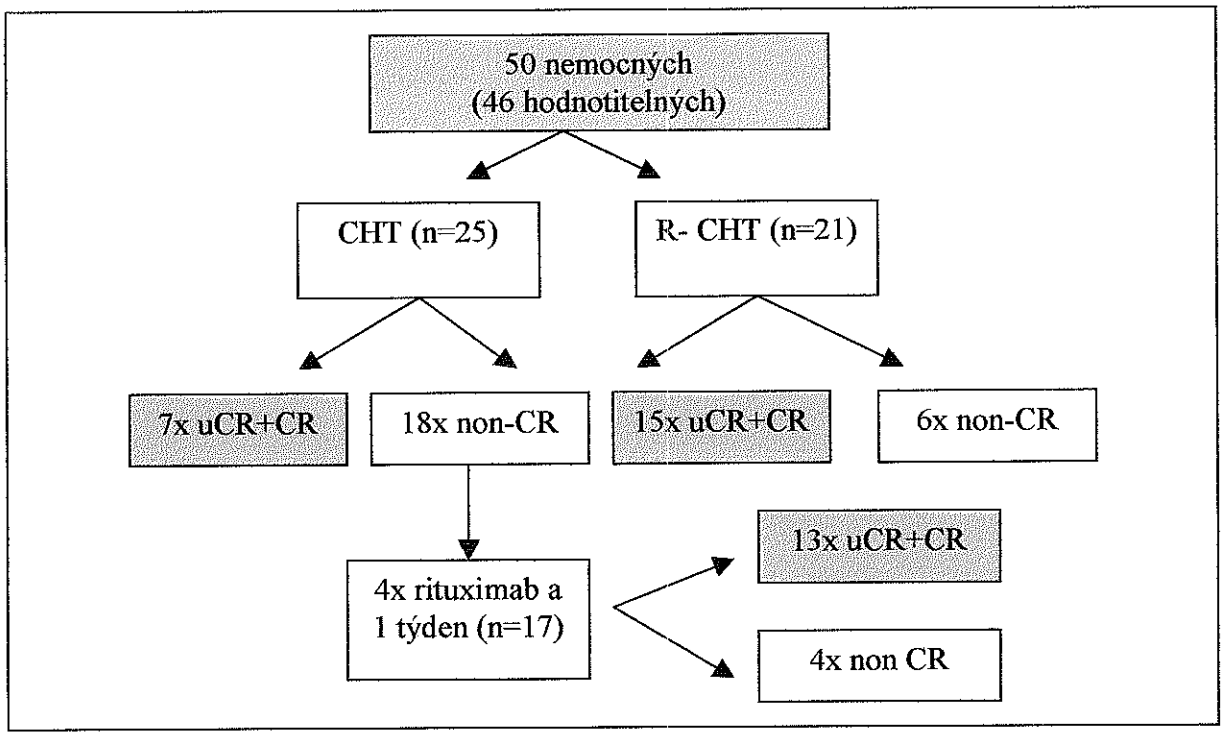
Rituximab byl podán ve standardním dávkování (tedy 375 mg/m^2 po 1 týdnu, celkem 4x) s cílem odstranění reziduální nemoci. Z klinického pohledu po podání rituximabu 8 ze 14 nemocných původně v PR dosáhlo CR, 2 pak uCR a 4 zůstali v PR. Všichni 3 nemocní, kteří byli hodnoceni jako uCR před podáním rituximabu, dosáhli následně klinicky CR. Celkem u 13/17 (76 %) nemocných došlo klinicky ke zlepšení celkové odpovědi po podání 4 dávek rituximabu.

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

5.5. Klinická a molekulární odpověď po celé léčbě

Z klinického pohledu v našem souboru z 50 nemocných bylo hodnotitelných stran klinické odpovědi celkem 46 nemocných (4 zemřeli při léčbě). Po R-CHT dosáhlo uCR+CR 15/21 nemocných, po samotné CHT 7/25 nemocných. Ze zbývajících 18 nemocných, kteří nedosáhli kompletní remise po CHT, bylo 17 léčeno konsolidační léčbou rituximabem. Po této léčbě se 13/17 nemocných dostalo do kompletní remise. Celkem tedy 35/46 nemocných dosáhlo v kterékoliv fázi léčby kompletní nebo nejisté kompletní remise onemocnění. Celkem 28 z těchto 35 nemocných dostalo v některé fázi léčby rituximab. Osud nemocných z klinického hlediska stran dosažení uCR + CR během jednotlivých fází léčby je znázorněn na obr.8.

Obrázek 8. Přehled klinické odpovědi – dosažení uCR + CR- u celého souboru dle jednotlivých linií léčby.



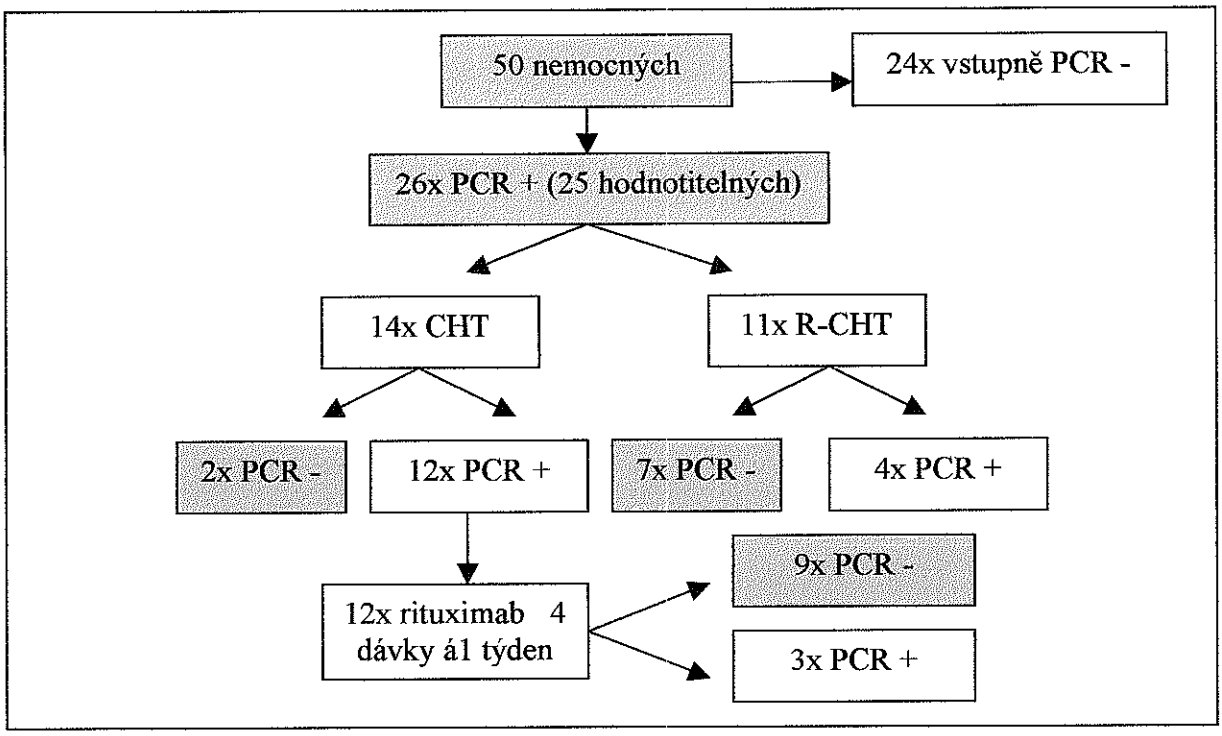
Statisticky byla analyzována pravděpodobnost dosažení uCR + CR podle jednotlivých vstupních parametrů po ukončení celé léčby. Z této analýzy vyplynulo, že jedinci mladšího věku a s lepším performance statusem dosáhli častěji uCR+CR.

Tabulka 9. Pravděpodobnost dosažení uCR + CR po celkovém ukončení léčby ve vztahu ke vstupním charakteristikám (n=46).

Parametr		uCR + CR n=46 (%)		uCR + CR n=46 (%)	P
Věk	**< 65 let**	**81**	**≥ 65 let**	**36**	**0.009**
Pohlaví	Muži	68	ženy	75	NS
Grade FL	1+2	65	3	100	NS
Linie léčby	první	71	relaps	67	NS
Stadium	I+II	71	III+IV	70	NS
B-symptomy	ano	56	ne	77	NS
PS	**0+1**	**76**	**2-5**	**33**	**0.05**
LDH	N	75	N	67	NS
Beta 2 mikroglobulin	< N	83	> N	63	NS
FLIPI	0-1	82	2-5	63	NS
Extranodální léze	ano	90	ne	65	NS
Postižení dřeně	ano	69	ne	75	NS
Rituximab **v 1.linii**	ano	73	ne	68	NS
PCR stav před léčbou	+	71	-	69	NS

Z molekulárního hlediska ze 26 vstupně Bcl-2/IgH nemocných bylo 25 pacientů hodnotitelných stran molekulární odpovědi (1 zemřel při léčbě). Po R-CHT dosáhlo Bcl-2/IgH negativity 7/11 nemocných, po samotné chemoterapii jen 2/14 nemocných. Ze zbývajících 12 nemocných, kteří nedosáhli molekulární remise, byli všichni léčeni konsolidační léčbou rituximabem (protože klinicky nedosáhli uCR nebo CR). Po této léčbě se 9/12 nemocných dostalo do molekulárně genetické remise. Celkem tedy 18/25 nemocných dosáhlo v kterékoliv fázi léčby molekulární remise onemocnění. Přehledně je toto znázorněno na obr.9

Obrázek 9. Přehled molekulárně genetické odpovědi (= Bcl-2/IgH negativita) u celého souboru .



Statisticky byla analyzována pravděpodobnost dosažení PCR negativity Bcl-2/IgH podle jednotlivých vstupních parametrů po ukončení celé léčby. Při sledování pravděpodobnosti dosažení molekulární remise po celé léčbě se jako statisticky významné parametry ukázaly: věk pod 65 let, lepší performance status a hraničně i FLIPI index –viz tab.10.

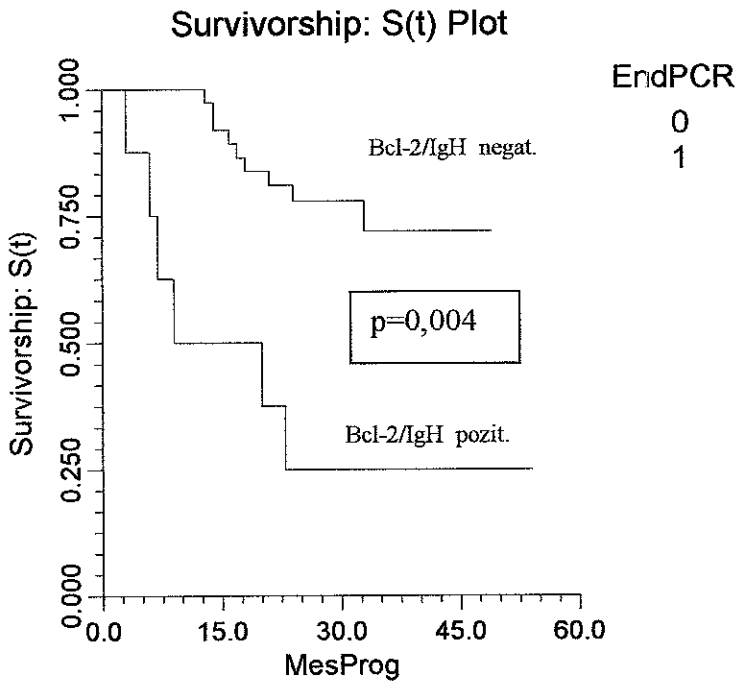
Tabulka 10. Pravděpodobnost dosažení Bcl-2/IgH negativity po ukončení celé léčby ve vztahu ke vstupním charakteristikám (N=25).

Parametr		Bcl-2/IgH negat. n=25 (%)		Bcl-2/IgH negat. n=25 (%)	P
Věk	**< 65 let**	**94**	**≥ 65 let**	**50**	**0.02**
Pohlaví	Muži	75	ženy	56	NS
Grade FL	1+2	65	3	100	NS
Linie léčby	První	73	relaps	67	NS
Stadium	I+II	50	III+IV	70	NS
B-symptomy	Ano	63	ne	71	NS
PS	**0+1**	**77**	**2-5**	**0**	**0.02**
LDH	N	83	N	54	NS
Beta 2mikroglobulin	> N	88	> N	60	NS
FLIPI	**0-1**	**100**	**2-5**	**56**	**0.05**
Extranodální léze	Ano	100	ne	64	NS
Postižení dřeně	Ano	68	ne	67	NS
Rituximab v 1.linii	Ano	64	ne	71	NS

5.6. Význam dosažení Bcl-2/IgH negativity na prognózu onemocnění.

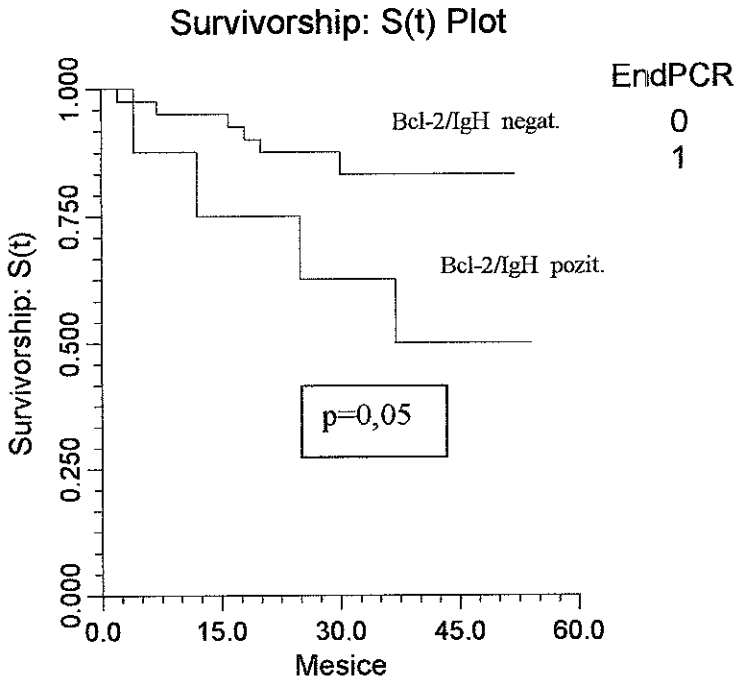
Ze souboru 26 nemocných vstupně Bcl-2/IgH pozitivních ke dni hodnocení zemřelo 5 nemocných - všichni na progresi lymfomu, 3 z nich byli ze skupiny, která nedosáhla nikdy Bcl-2/IgH negativity. Následný relaps/progrese lymfomu byly po léčbě zaznamenány u 10 ze 23 (43 %) hodnotitelných pacientů (3 nemocní zemřeli během léčby) s mediánem doby do relapsu/progrese 15,5 měsíců. U skupiny, kde během léčby v kterékoli fázi bylo dosaženo Bcl-2/IgH negativity, došlo k relapsu či progresi u 4/15 pacientů (27 %), u nadále Bcl-2/IgH pozitivních pak u 6/8 případů (75 %) – tento rozdíl byl statisticky významný (p=0,004). Pravděpodobnost 2-letého přežití bez progrese byla u pacientů s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou 38 %, u Bcl-2/IgH negativních 81 % – viz.obr.10

Obrázek 10. Porovnání křivek doby do progrese u skupiny s dosaženou Bcl-2/IgH negativitou v kterékoliv fázi léčby (modře) se skupinou Bcl-2/IgH pozitivních po celé léčbě (červeně).



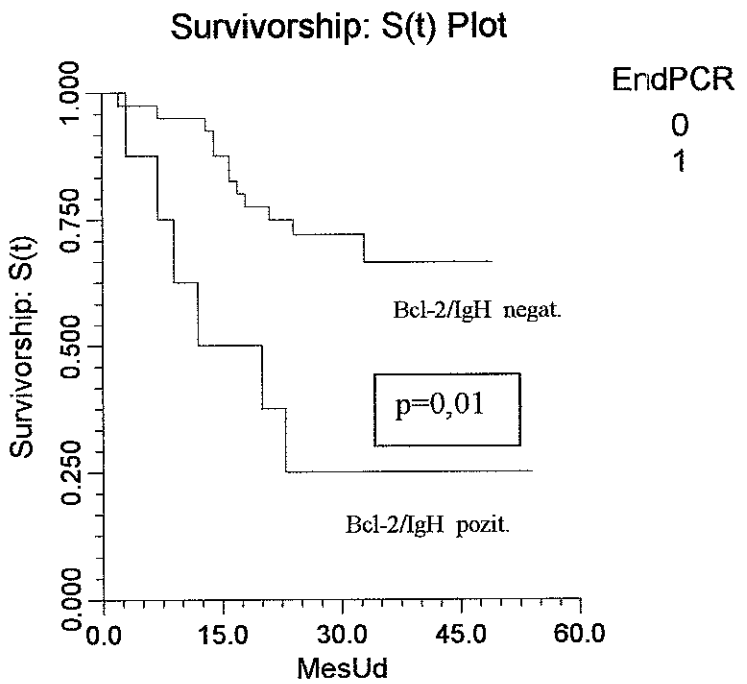
Ke dni hodnocení žije 21/26 nemocných (81 %), ve skupině nadále Bcl-2/IgH pozitivních žije 4/8 nemocných (50 %), ve skupině Bcl-2/IgH negativních žije 17/18 pacientů (94 %). Pravděpodobnost dvouletého přežití u obou podskupin byla 74 % vs. 87 % - tento rozdíl byl hraničně statisticky významný (p=0,05) – viz obr.č.11.

Obrázek 11. Porovnání křivek celkového přežití skupiny s dosaženou Bcl-2/IgH negativitou v kterékoliv fázi léčby (modře) se skupinou Bcl-2/IgH pozitivních po celé léčbě (červeně).



Stejně tak i pravděpodobnost dvouletého přežití bez události byla u skupiny s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou 37 %, u Bcl-2/IgH negativních 75 %. Tento rozdíl byl statisticky významný (p=0,01) –viz obr.12

Obrázek 12. Porovnání křivek přežití bez události u skupiny s dosaženou Bcl-2/IgH negativitou v kterékoliv fázi léčby (modře) se skupinou Bcl-2/IgH pozitivních po celé léčbě (červeně).



Medián sledování této časti souboru je 34 měsíců (4-54 měsíců). Porovnáním vstupních charakteristik s výsledky léčby bylo zjištěno, že v našem souboru bylo dosažení Bcl-2/IgH negativity asociováno s těmito faktory: věk < 65 let (p=0,02), performance status 0+1 v úvodu (p=0,02) a hraničně i index FLIPI (p=0,05) – viz tab.9. Porovnáním léčebných výsledků nemocných, kteří kdykoliv během léčby dosáhli Bcl-2/IgH negativity se skupinou, u kterých přetrvávala Bcl-2/IgH pozitivita, byl nalezen rozdíl mezi oběma skupinami v delší době do progrese, době do události a hraničně i v delším přežití ve prospěch skupiny Bcl-2/IgH negativních po léčbě. PCR negativní status po léčbě tak byl dle našeho sledování spojen s dlouhodobější remisí onemocnění, nižším rizikem relapsu a s naznačeným trendem k delšímu celkovému přežití. Pomocí univariantní analýzy bylo zkoumáno, které faktory byly asociovány s vymizením Bcl-2/IgH přestavby po celé léčbě. Z analýzy vyplývá, že jedinci, u kterých bylo dosaženo molekulární remise, jsou mladšího věku a s lepším performance

statusem. Dosažení PCR negativity je pak spojeno s nižším rizikem relapsu onemocnění – viz tab.11.

Tabulka 11. Klinické, laboratorní a léčebné charakteristiky nemocných ve vztahu k vymizení či přetrvávání Bcl-2/IgH přestavby po celé léčbě.

	Bcl-2/IgH negativní, N = 18 (%)	Bcl-2/IgH pozitivní, N = 8 (%)	P value
Mužské pohlaví	73	50	NS
Věk ≥ 65 let	**6**	**50**	**0.02**
Grade FL			
I+II	89	100	NS
Stadium			
I+II	6	13	NS
B-symptomy	28	38	NS
Performance status			
0-1	**100**	**63**	**0.02**
LDH > normu	44	75	NS
Beta 2 mikroglobulin > normu	59	86	NS
Bulk > 5cm	6	13	NS
Extranodální postižení (mimo dřeň)	17	0	NS
Postižení dřeně	89	88	NS
FLIPI			
3-5 (vysoké riziko)	33	50	NS
Dosažení uCR + CR	50	25	NS
Rituximab v léčbě	94	88	NS
Režimy podané léčby			
CHOP-like +- rituximab	67	75	NS
Relaps/progrese	**27**	**75**	**0.04**
Žijící nemocní	**94**	**50**	**0.02**
Délka sledování (medián, měsíce)	33	38	NS

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

U 23 ze 26 vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných bylo diagnostikováno postižení obou kompartmentů současně (ve 21 případech MBR, u 2 nemocných mcr). U dvou pacientů byla Bcl-2/IgH pozitivita kostní dřeně při negativitě Bcl-2/IgH v periferní krvi, u jednoho nemocného naopak byl záchyt Bcl-2/IgH elementů jen v periferní krvi při negativním nálezu v kostní dřeni. Po léčbě samotnou chemoterapií zůstalo 12 pacientů Bcl-2/IgH pozitivních v periferní krvi a/nebo v kostní dřeni, po podání rituximabu s chemoterapií zůstali 4 pacienti Bcl-2/IgH pozitivní. Celkem u 16 nemocných tedy byla zkoumána korelace mezi nálezy v kostní dřeni a periferní krvi i po léčbě. U 12 z 16 nemocných (75 %) byla nalezena Bcl-2/IgH pozitivita po léčbě v obou kompartmentech. Ze zbývajících 4 nemocných 3 byli Bcl-2/IgH negativní v periferní krvi s přetrvávající pozitivitou ve dřeni a naopak u jednoho nemocného jsme dosáhli vymizení Bcl-2/IgH v kostní dřeni, ale přetrvávala u nich pozitivita v periferní krvi. Onemocnění se tak jeví více rezistentní k léčbě v kostní dřeni než v periferní krvi.

5.8. PCR analýza Bcl-2/IgH v periferní krvi a kostní dřeni - porovnání s výsledky imunohistochemického průkazu bcl-2 ve vzorcích kostní dřeně.

V této části práce byla zkoumána korelace mezi PCR pozitivitou Bcl-2/IgH v periferní krvi a/nebo kostní dřeni a pozitivním imunohistochemickým (IHCH) průkazem bcl-2 proteinu v histologickém vzorku kostní dřeně, který byl k dispozici od všech 26 pacientů vstupně Bcl-2/IgH pozitivních. IHCH pozitivita byla nalezena u 24 z 26 vzorků kostní dřeně (92 %) PCR pozitivních nemocných. Zajímavostí bylo, že 5 IHCH pozitivních vzorků dřeně (21 %) bylo nalezeno i ve skupině 24 vstupně Bcl-2/IgH negativních pacientů při PCR vyšetření pro oblast MBR a mcr. Svědčí to pro skutečnost, že jistě existují další zlomová místa na 18.chromozómu, která nebyla námi používanou PCR metodikou odhalena.

6. Diskuse

Detekce translokace t(14;18) představuje na první pohled ideální cíl pro sledování aktivity folikulárního lymfomu. Její výskyt u nemocných s FL je relativně vysoký, existuje celá řada metod k její detekci. Přesto v této oblasti zůstává stále mnoho nejasného – a to jak z důvodu výše popsaných biologických aspektů (záchyt u zdravých jedinců, různá zlomová místa), tak i technických důvodů (různé metody používané pro stanovení přestavby). V našem souboru 50 nemocných jsme prokázali přítomnost Bcl-2/IgH přestavby v MBR nebo mcr oblasti u 52 % nemocných, což odpovídá výsledkům prezentovaným ostatními autory z evropských pracovišť. Italští autoři nalezli Bcl-2/IgH pozitivitu u 69 % (108), francouzští pak v 64 % (207). Relativně nižší výskyt v našem souboru je pravděpodobně způsoben skutečností, že z technických důvodů byla testována jen 2 nejčastější zlomová místa – MBR a mcr.

Frekvence záchytu translokace t(14;18) je podle literatury velmi variabilní. Příčinou jsou jednak vlivy geografické, ale i technické. Výskyt folikulárního lymfomu je obecně nižší ve východní Asii (110). Problematice výskytu t(14;18) pozitivních FL ve světě se zabývá mnoho prací – z metaanalýzy 27 studií vyplývá rozdíl ve výskytu mezi Východní Asií (38 %), Evropou (61 %) a USA (71 %), jak bylo prezentováno v práci izraelských autorů (115). Problémem ale mohou být odlišné metodiky a techniky stanovení t(14;18) – i proto se autoři domnívají, že částečně je „geografický" rozdíl mezi Asií a Evropou + USA způsoben spíše technickými odlišnostmi stanovení než vlastními geografickými rozdíly (115). K detekci Bcl-2/IgH přestavby máme k dispozici několik metod – od klasické cytogenetiky se záchytností maximálně v 70 % případů, přes FISH (literárně popisovaný záchyt 70-100 %) až po celou řadu variant PCR metod (standardní PCR, nested PCR, multiplex PCR, long distance PCR, kvantitativní real-time PCR) či Southern blotting. Hlavní výhodou PCR metodik je vysoká senzitivita ($1:10^4$ nádorových buněk) a relativní rychlost. Nevýhodou pak zatím nedostatečná reprodukovatelnost jednotlivých metod mezi jednotlivými laboratořemi (142) a nutnost existence specifických primerů pro jednotlivá zlomová místa. Rovněž poměr mezi výskytem MBR a mcr přestavby je popisován v literatuře variabilně. V našem souboru byl záchyt Bcl-2/IgH přestavby pro oblast mcr jen v 8 %, zatímco jiné práce uvádějí výskyt až 31 % (63). Tento rozdíl může ale být způsoben velikostí našeho souboru.

V otázce korelace mezi nálezem vstupní Bcl-2/IgH pozitivity a klinickou charakteristikou před zahájením léčby jsme shledali pouze 2 faktory, které byly spojeny s vyšším výskytem Bcl-2/IgH pozitivity v úvodu: postižení dřeně a věk do 65 let. Mladší

nemocní měli v našem souboru statisticky častější výskyt Bcl-2/IgH přestavby než jedinci starší 65 let. Obdobné výsledky prezentovali i španělští autoři (109). Celkově ale přítomnost Bcl-2/IgH přestavby v úvodu v našem souboru neovlivnila dosažené výsledky léčby ani parametry celkového přežití oproti podskupině Bcl-2/IgH negativních nemocných před léčbou. Jediný rozdíl mezi oběma skupinami byl shledán v pravděpodobnosti následného relapsu/progrese. Tyto události byly zaznamenány u 15/25 (60 %) vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných s mediánem doby do relapsu/progrese 16 měsíců, ale jen u 5/20 (25 %) vstupně Bcl-2/IgH negativních nemocných. Tento rozdíl můžeme vysvětlit tím, že ve skupině vstupně Bcl-2/IgH negativních se nacházelo relativně více jedinců v vyšším gradingem lymfomu (tedy FL gr.3 v přechodu do DLBCL), kde je riziko následného relapsu nižší než u indolentních lymfoproliferací. V otázce významu vstupní Bcl-2/IgH pozitivity na prognózu nemocných s FL jsou literárně publikované výsledky rozporuplné – zatímco některé práce jsou ve shodě s našimi výsledky – tedy, že nemá vliv na OS (109), někteří autoři publikovali vztah mezi Bcl-2/IgH negativitou ve vztahu k delšímu OS (36), jiní naopak ve vztahu ke kratšímu OS (164, 204). Tyto diskrepance mohou souviset v nedostatečné homogenitě a obtížné porovnatelnosti analyzovaných souborů a metodik. Na tomto místě nutno upozornit na důležitý limitující faktor našeho souboru, a tím bylo stanovení pouze 2 nejčastějších zlomových míst – MBR a mcr, které mohlo ovlivnit získané výsledky této části analýzy.

Samotná chemoterapie vede k dosažení Bcl-2/IgH negativity jen u malé části nemocných – v našem souboru dosáhlo negativity 14 % nemocných. V práci italských autorů tomu bylo po chemoterapii CHOP u 30 % nemocných (164). Nižší procento molekulárních remisí po samotné chemoterapii bylo spojeno v našem souboru i se statisticky signifikantně nižší pravděpodobností dosažení klinické kompletní remise oproti skupině léčené kombinací rituximabu a chemoterapie (28 % vs. 71 %, p= 0,007). Přidání rituximabu k chemoterapii vedlo u našich nemocných ke statisticky vyššímu procentu dosažení molekulárních remisí než po podání samotné CHT (14 %), a to u 64 % nemocných. Tento rozdíl byl statisticky významný (p=0,037). Význam rituximabu pro dosažení molekulárně genetické remise onemocnění byl prezentován mnoha autory, a to jak při podání v monoterapii (207), tak v kombinaci s chemoterapií CHOP (204). Z 18 nemocných ve studii Czuczmana a kol. bylo informativních pro Bcl-2/IgH přestavbu 7 pacientů - u všech došlo po podání 6 cyklů R-CHOP k dosažení molekulárně genetické remise. U naší skupiny nemocných léčených samotnou CHT, kterým byly podány 4 dávky rituximabu po 1 týdnu, dosáhlo 9/12 (75 %) molekulární remise. Nástup Bcl-2/IgH negativity byl pozvolný, 7/12 nemocných dosáhlo

vymizení Bcl-2/IgH přestavby při kontrole za 1 měsíc po skončení léčby rituximabem, 2 ze zbývajících 5 pak v intervalu 3, resp.6 měsíců po léčbě. Doznívající efekt rituximabu je způsoben přetrváváním jeho hladiny několik měsíců po poslední dávce. Rambaldi a kol. prezentovali výsledky sledování MRN po chemoterapii CHOP s následným sekvenčním podáním rituximabu u skupiny 128 nemocných s FL. Po chemoterapii CHOP bylo zařazeno do sledování MRN 77 nemocných, kterým byly podány sekvenčně 4 dávky rituximabu po 1 týdnu. Molekulárně genetická odpověď byla sledována 12, 28 a 44 týdnů po podání rituximabu. PCR negativity dosáhlo v daných časových obdobích 59 %, 74 % resp.63 % nemocných. Dosažení Bcl-2/IgH negativity v této práci korelovalo s lepší prognózou onemocnění (164). Skutečnost, že podání rituximabu kdykoliv během terapie v našem souboru nebylo statisticky signifikantně spojeno s lepší molekulárně biologickou odpovědí je způsobena tím, že počet nemocných, kteří rituximab nedostali, byl velmi nízký.

Hlavním cílem naší práce bylo zhodnotit klinický význam dosažení Bcl-2/IgH negativity na osud nemocných. Dosažení molekulární remise v kterékoliv fázi léčby bylo v našem sledování spojeno se statisticky významně delším obdobím do progrese (p=0,004) i období do události (p=0,01) oproti skupině Bcl-2/IgH pozitivních. Vliv na prodloužení celkového přežití byl shledán jako hraniční (p=0,05) ve prospěch po léčbě Bcl-2/IgH negativních pacientů. Pozitivní význam dosažení molekulárně genetické remise na prognózu onemocnění byl prezentován mnoha autory, a to jak po podání intenzivní chemoterapie – „alternative tripple therapy" a FND (166), tak po podání samotného rituximabu (207) či vysokodávkované léčby s podporou kmenových buněk (187). Existují ale i práce, které tuto hypotézu nepodporují. Ve Foranově práci je prezentováno 62 % nemocných, kteří dosáhli po 4 dávkách rituximabu molekulárně genetické remise onemocnění – tato skutečnost ale nekorelovala s klinickou odpovědí (146). Podobně rozporuplné výsledky prezentoval Mandigers, který vyšetřoval Bcl-2/IgH přestavbu u nemocných po chemoterapii COP s interferonem alfa. Dosažení molekulárně genetické remise v této studii nekorelovalo s klinickou prognózou nemocných (208). Závěrem lze shrnout, že naše studie prokázala statisticky významně vyšší procento CR i molekulárních remisí po podání imunochemoterapie s rituximabem oproti samotné chemoterapii a současně i unikátní schopnost rituximabu dosáhnout eliminace Bcl-2/IgH pozitivních buněk v periferní krvi a/nebo v kostní dřeni, které přetrvávaly po podání chemoterapie samotné (v 75 %). Z tohoto pohledu je oproti jiným postupům, které jsou schopny vést k dosažení molekulární remise (např.autologní transplantace) hlavní výhodou rituximabu nízká toxicita, čímž odpadá riziko pozdní toxicity, tedy vzniku sekundárních malignit (zejména MDS a AML). Přestože nemocní po dosažení

Bcl-2/IgH negativity již nebyli dále dlouhodobě molekulárně geneticky sledováni, lze konstatovat, že dosažení molekulární remise do 6 měsíců po léčbě bylo v naší práci spojeno s lepší prognózou nemocných stran PFS a EFS. Význam dosažení Bcl-2/IgH negativity stran delšího přežití byl hraniční, z tohoto pohledu bude nutné delší sledování souboru. Skutečnosti, že podání rituximabu v první linii nevedlo ke statisticky vyššímu procentu dosažených molekulárních i klinických remisí po ukončení celé léčby je způsobena tím, že ve druhé skupině, vstupně léčené samotnou chemoterapií, dostala relativně velká část nemocný rituximab sekvenčně v rámci konsolidační terapie, čímž se vstupní rozdíly mezi oběma skupinami stírají.

Hlavní problém pro zavedení monitorování Bcl-2/IgH pozitivních buněk v periferní krvi/kostní dřeni v běžné klinické praxi vyplývá z toho, že i přes dosažení Bcl-2/IgH negativity nemusí dojít k eliminaci vlastního nádoru v uzlinách. Oba kompartmenty (periferní krev i kostní dřeň) jsou totiž až sekundárně postiženými oblastmi – primárně se jedná o uzlinové onemocnění. Tím se onemocnění liší od jiných hematologických malignit (jako například chronická myeloidní leukémie), kde je monitorování minimální reziduální nemoci již součástí rutinní praxe a řídí se podle něho i léčba nemocných. Naopak u lymfomů i přes dosažení Bcl-2/IgH negativity v periferní krvi/kostní dřeni nelze vyloučit přítomnost reziduálních nádorových buněk v původně postižených uzlinách. Ověřování přítomnosti této reziduální nemoci pomocí biopsií by z praktického hlediska bylo obtížné.

Dalším problémem je rozdílná záchytnost Bcl-2/IgH pozitivních buněk v periferní krvi oproti kostní dřeni. V našem souboru bylo u 23 ze 26 Bcl-2/IgH pozitivních nemocných zjištěno postižení obou kompartmentů současně. Korelace mezi oběma kompartmenty tedy byla v našem souboru velmi dobrá. Podobné výsledky prezentoval Summers (161), naopak některé práce poukazují na kostní dřeň jako spolehlivější kompartment pro průkaz Bcl-2/IgH elementů než periferní krev (158). Po léčbě u skupiny s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou byla shledána shoda mezi periferní krví a kostní dření u 11 z 18 nemocných (61 %). U 5 z 18 nemocných bylo dosaženo Bcl-2/IgH negativity v periferní krvi při přetrvávající pozitivitě v kostní dřeni a naopak u 2 z 18 nemocných dosáhli vymizení Bcl-2/IgH v kostní dřeni s detekovatelnými Bcl-2/IgH pozitivními elementy v periferní krvi. Účinnost léčby (zejména rituximabu) při eliminaci Bcl-2/IgH pozitivních buněk se jeví vyšší v periferní krvi než v kostní dřeni. K obdobným závěrům dospěli například i italští autoři (164). Závěrem lze konstatovat, že pro zavedení monitorování Bcl-2/IgH do běžné klinické praxe je nezbytné sjednocení metodik stanovení této přestavby mezi laboratořemi a současně i stanovení

optimálního kompartmentu, ve kterém by mělo být sledování prováděno – zda jím bude periferní krev, kostní dřeň nebo lymfatická uzlina, není dosud zcela jasné. Z technického hlediska je nejjednodušší vyšetřování periferní krve, event.kostní dřeně. Nejcitlivějším ukazatelem by pravděpodobně bylo vyšetřování uzlin pomocí punkce tenkou jehlou, tato metoda naráží ale na technické problémy s jejím provedením.

Závěrem nutno konstatovat, že přestože Bcl-2/IgH přestavba zatím představuje nejschůdnější způsob sledování MRN u nemocných s FL, k úplnému pochopení biologie a její role pro stanovení jednoznačné prognózy nemocných s FL je třeba dalších výzkumů.

7.Přílohy

7.1. Seznam použité literatury

1. Trněný M., Vášová I., Pytlík R. et al. - Distribuce podtypů non-Hodgkinského lymfomu v České republice a jejich přežití – Klinická onkologie 2007; 20:340-348
2. Harris NL, Jaffe ES.et al.- WHO classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tisssues. Report of the clinical advisory committee meeting – Airle House, Virginia, November 1997; J Clin Oncol 17; 1999:3835-3849.
3. Armitage JO. Treatment of non-Hodgkin´s lymphoma. New Engl J Med 1993; 328:1023-30.
4. Groves FD, Linet MS et al.- Cancer surveillance series: non-Hodgkin´s lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. J Nat Cancer Inst. 2000; 92:1240-1251.
5. Armitage J., Wiesenburger D. New approach to classifying non-Hodgkin´s lymphomas. Clinical features of the major histologic subtypes. J Clin Oncol 1998; 16:2780-2795.
6. Schein PS et al. Non-Hodgkin´s lymphoma: pattern of relapse from complete remission after combination chemotherapy Cancer 1975; 35:354-357.
7. Sander CA, Yano T, Clark HM et al. P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. Blood 1993; 82:1994-2004.
8. Horning SJ. Natural history and therapy for the indolent non-Hodgkin´s lymphomas. Semin Oncol.1993; 20:75-88.
9. Vose JM Current aproaches to the managment of non Hodgkin´s lymphoma Semin Oncol 1998; 25:483-91.
10. Lister TA. The management of follicular lymphoma. Ann Oncol 1991; 2:131-135.
11. Romanguera JE, McLaughlin P et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular lymphoma: A risk model. J Clin Oncol 1999; 9:762-769.
12. MacManus MP, Hoppe RT Is radiotherapy curative for stages I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University. Journal of Clinical Oncology 1996; 14:1282-1290.
13. Johnson PW, Rohatiner SA et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. J Clin Oncol. 1995; 13:140-147.

14. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME et al. Distinctive chromosomal abnormalities in histologie subtypes of non-Hodgkin´s lymphoma. N Engl J Med 1982; 307:1231-1236.

15. Humlová Z Protooncogene bcl-2 in Process of Apoptosis. Sborník Lékařský 2002; 103:419-425.

16. O´Neill JW, Hockenbery DM Bcl-2 related proteins as drug targets Curr Med Chem 2003; 10(16): 1553-1562

17. Silverman GA, Green ED, Young RL et al. Meiotic recombination between artificial chromosomes yields a sinle clone containing the entire BCL-2 protooncogene. Proc Natl Acam Sci 1990; 87:9913-9917.

18. Tsijumoto Y, Groce CM Analysis fo the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc.Natl.Acad.Sci.1986; 83:5214-5218.

19. Kane DJ, Safarian TA, Anton R et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science 1993; 262:1274-1277.

20. Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H et al. Prevention of hypoxia-induced cell death by bcl-2 and Bcl-x. Nature 1995; 374:811-813.

21. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticosteroids and multiple chemotherapeutic drugs. Cancer Res 1992; 52:5407-5411.

22. Kamesaki S et al. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced strand breaks and their repair. Cancer res 1993; 53:4251-4256.

23. Aster J, Kobayashi Y, Shiota M, Mori S, Sklar J Detection of the t(14;18) at Similar Frequencies in Hyperplastic Lymphoid Tissues from American and Japanese Patients. Am J Pathol 1992; 141:291-299

24. Hirsch T, Marzo I et al. Role of mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. Bioscience Reports 1997; 17:67-76

25. Kroemer G. The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat Med. 1997; 3:614-620

26. Boise L, Gonzalez-Garcia M, Postema Ch et al. bcl-x, a bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. Cell 1993; 74: 597-608

27. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature 1993; 362:849-852.

28. Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the reulation of programmed cell death. Cancer Res. 1999; 59 (7suppl):1693-1700

29. Oltvai ZN, Miliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74:609-619.

30. Mc Donnel TJ, Deanne N et al. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. Cell 1989; 57:79-88.

31. Pezzela F, Tse AG, Cordell JL et al. Expression of bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 translocation. Am J Pathol 1990; 137:252-232

32. Colombel M, Symmanas F, Gil S et al. Detection of the apoptosis-supressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. Am J Pathol 1993; 143:390-400.

33. Campos L, Rouault JP, Sabido O et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Blood 1993; 81:3091-3096.

34. Maung ZT, MacLean FR et al. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukemia. Br J Haematol 1994; 88:105-109

35. Fukuhara S, Rowley JD et al. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. Cancer Res 1979; 39:3119-3128.

36. Yunis JJ, Martin MD, Oken M et al. Distinctive Chromosomal Abnormalities in Histologic Subtypes of Non-Hodgkin's Lymphoma. NEJM 1989; 307:1047-1054

37. Tsijumoto Y, Finger L, Yunis J. et al. Cloning of the chromosome braekpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science 1984; 226:1097-1099

38. Wyatt RT, Rudders RA, Zelenetz A et al. Bcl-2 oncogene translocation is mediated by chi-like consensus. J Exp Med 1992; 175:1575-1588.

39. Ngan BY, Nourse J, Cleary ML. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. Blood 1989; 73:1759-1762

40. Bakshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell 1985; 41:899-906.

41. Cleary M, Galili N, Sklar J Detection of a Second t(14;18) Breakpoint Cluster Region in Human Follicular Lymphomas J. Exp. Med. 1986; 164:315-320.

42. Cleary ML, Sklar J Nucleoside sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. Proc.Natl.Acad.Sci.1985; 82:7439-7443

43. Cleary ML, Smith SD et al. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin trancript resulting from the t(14;18) translocation. Cell 1986; 47:19-28.

44. Bakhshi A, Wright JJ, Graniger W, et al. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of the both derivate 14 and 18 reciprocal partners. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:2396-2400

45. Meijrink JP, Raemaekers MM et al. New type of t(14;18) in a non-Hodgkin's lymphoma provides insight in molecular events in early B-cell differentiation. Br J Heamatol 1995; 91:630-639.

46. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL et al. MCL1, a gene expressed in programmed cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. Proc.Natl.Acad.Sci.1993; 90:3516-3520.

47. Seto M, Jaeger U, Hockett RD et al. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. EBMO J 1988; 7:123-131.

48. Tsijumoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce DM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 1985; 228:1440-1443.

49. Graninger WB, Seto M, Boutain B et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion trancripts in normal and neoplastic cell. J Clin Invest 1987; 80:1512-1515.

50. Hua Cm Raffeld, Ko HS et al. Mechanism of bcl-2 activation in human follicular lymphoma. Oncogene 1990; 5:233-235.

51. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1992; 80:879-886.

52. Linette GP, Li Y et al. Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation – inaugural paper. Proc Natl Acad 1996; 93:9545-9552.

53. Mazel S, Burtrum D et al. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. J Exp Med 1996; 183:2219-2226.

54. McDonnel TJ, Deane N, Platt FM et al. Bcl-2 Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. Cell 1989; 57:79-88.

55. Husson H, Carideo EG, Neuberg D et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. Blood 2002; 99:282-289.

56. Viardot A, Möller P, Högel J, Werner K et al. Clinicopathologic Correlations of Genomic Gains and Loses in Follicular Lymphoma. J Clin Oncol 2002; 20:4523-4530.

57. Tilly H, Rossi A et al. Prognostic value of chromosomal abberations in follicular lymphomas. Blood 1994; 84:1043-1049.

58. Price CGA, Meerabux J, Murtagh S et al. The significance of circulating cells carrying t(14;18) in long remission from follicular lymphoma. J ClinOncol 1991; 9:1527-1532.

59. Finke J, Slanina J et al. Persistence of circulating t(14;18) – positive cells in long term remission after radiation therapy for localizde-stage follicular lymphoma. J Clin Oncol 1993; 11:1668-1673.

60. Finke J, Slanina J, Lange W and Dölken G Persistence of Circulating t(14;18)-Positive Cells in Long Term Remission After Radiation Therapy for Localized-Stage Follicular Lymphoma. J Clin Oncol 1993; 11:1668-1673

61. McDonnel T, Korsmeyer SJ Progression from lymphoid hyperplasia to high grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). Nature 1991; 349:254-256.

62. Yang E, Korsmyer SJ Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL-2 Family and Cell Death. Blood 1996; 88:386-401

63. Weiss LM, Roger MD, Warnke A et.al. Molecular Analysis of the t(14;18) Chromosomal Translocation in Malignant Lymphomas. NEJM 1987; 317:1185-1189

64. Lipford E, Wright JJ et al. Refinement of lymphoma cytogenetics by the chromosome 18q21 major breakpoint region. Blood 1987; 70: 816-1823

65. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA et al. Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large cell lymphoma. NEJM 1989; 320:1047-1054.

66. Papajík T, Jedličková K, Krigerová E, et al. Polymerase chain reaction detection of cells carrying t(14;18) in bone marrow of patients with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: the importance of analysis at diagnosis and significance of long term follow-up. Neoplasma 2001; 6:501-505.

67. Mounier N,Briere J, Gisselbrecht C et al.Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2 resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Blood 2003; 101:4279-84.

68. Koduru PR, Filippa DA et al. Cytogenetic and histologic correlations in malignant lymphoma. Blood 1987; 69:97-102.

69. Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G et al. Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma. J Cancer Res 1983; 43:2975-2984.

70. Corradini P, Astolfi M, Cherasco C et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin´s lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. Blood 1997; 89:724-731.

71. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajevski S et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin´s lymphoma. Blood 1997; 90:244-251.

72. Taub R, Kirsch I, Morton C et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. Proc.Natl.Acad.Sci.1982; 79:7837-7841.

73. Fenton JA, Vaandrager JW, Aarts WM et al. Follicular lymphoma with a novel t(14;18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch region indicates an origin from germinal center B cells. Blood 2002; 99:716-718.

74. Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H et al. Refinement of the BCL2/Immnoglobulin Heavy Chain Fusion Gene in t(14;18)(q32;q21) by Polymerase Chain Reaction Amplification for Long Targets. Genes, Chromosomes and Cancer 1998; 21:17-29.

75. Albinger-Hegyi A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyi I et al. High Frequency of t(14;18)-Translocation Breakpoints Outside of Major Breakpoint and Minor Cluster Regions in Follicular Lymphomas. Improved Polymerase Chain Reaction Protocols for Their Detection. Am J Pathol 2002; 160:823-832.

76. Rimokh R, Gadoux M, Bertheas MF et al. FVT-1, a novel human transcription unit affected by vatiant translocation t(2;18)(P11;q21) of follicular lymphoma. Blood 1993; 81:136-142.

77. Adachi M, Tefferi A et al. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 1990; 171:559-564.

78. Yonetani N, Ueda C, Akasaka T et al. Heterogeneous breakpoints on the immunoglobulin genes are involved in fusion with the 5′ cluster region of the bcl2 gene in lymphoid neoplasm: a summary of nine cases. Leukemia. 1996; 10:970-977.

79. Seto M, Osada H, Ueda R, Ito Ch et al. Bcl-2 Translocation in Japanese B Cell Lymphoma: Novel bcl-2 Translocation with Immunoglobulin Heavy Chain Diversity Segment. Jpn J Cancer Res 1991; 82:65-71.

80, Osada H, Seto M, Ueda R et al. Bcl-2 gene rearrangement analysis in Japanese B cell lymphoma; novel bcl-2 recombination with immunoglobulin kappa chain gene. Jpn J Cancer Res 1989; 80:7111-715.

81. López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnel TI, McLaughlin P et al. Correlation of Bcl-2 Rearrangements With Clinical Characteristic and Outcome in Indolent Folicular Lymphoma. Blood 1999; 93:3081-3087.

82. Gribben JG, Freedman AS, Woo SD, Blake K et al. All Advanced Stage Non-Hodgkin´s Lymphomas With a Polymerase Chain Reaction Amplificable Breakpoint of bcl-2 Have residual Cells Containing the bcl-2 Rearrangements et Evaluation and After Treatment. Blood 1991; 78:3275-3280.

83. Meijerink JPP T(14;18), a journey to eternity. Leukemia 1997; 11:2175-2187

84. Hill M, MacLennan A, Cunningham DC et al. Prognostic significance of bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large B-cell non-Hodgkin´s lymphoma. A British national lymphoma investigation study. Blood 1996; 88:1046-1051.

85. Moos M, Schulz R, Martin S, Benner A et al. The remission status before and the PCR status after high-dose therapy with peripheral blood stem cell support are prognostic factors for relapse-free survival in patients with follicular non-Hodgkin´s lymphoma. Leukemia 1998; 12:1971-1976.

86. Ladetto M, Drandi D, Compagno M, Astolfi M et al. PCR-Detectable Nonnneoplastic Bcl-2/IgH Rearrangements Are Common in Normal Subjects and Cancer Patients at Diagnosis but Rare in Subjects Treated With Chemotherapy. J Clin Oncol 2003; 21:1398-1403.

87. Tsimberidou AM, Jiang Y, Ford R et al. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of Circulating Cells with T(14;18) in Volunteer Blood Donors and Patients with Follicular Lymphoma. Leukemia and Lymphoma 2002; 43 (8):1589-1598.

88. Dölken G, Illerhaus G, Hirt C, Martelsman R BCL-2/JH Rearrangements in Circulating B Cells of Healthy Blood Donors and Patients With Nonmalignant Diseases. J Clin Oncol 1996; 14:1333-1344.

89. Delage R, Roy J, Jacques L et al. Multiple bcl-2/Ig gene reararngements in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. Br J Heamatol 1997; 97:589-595.

90. Schuler F, Hirt C et al. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. Semin Cancer Biol 2003; 13(3):203-209.

91. Biagi JJ, Seymour JF. Insights into thel moleculat pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. Blood 2002; 99(12):4265-4275.

92. Sarris A, Jiang Y, Tsimberidou A, Thomaides A et al. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Monitoring Minimal Residual Disease in Patients With Advanced Indolent Lymphomas Treated With Rituximab, Fludarabine, Mitoxantrone, and Dexamethasone. Seminars in Oncology 2002; 29:48-55.

93. Limpens J, De Jong D et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplazia. Oncogene 1991; 6:2271-2276.

94. Limpens J, Stad R et al. B-cells with the lymphoma associated translocation t(14;18) are present in blood B-cells of normal individuals. Blood 1992 (Suppl.1); 80:258a.

95. Liu Y., Hernandez A et al. BCL-2 translocation frequency rises with age in humans. Proc Natl.Acad Sci USA 1994; 91:8910-8914.

96. Summers KE, Goff LK, Wilson AG et al. Frequency of the Bcl-2/IGH rearrangement in normal indivuduals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. J Clin Oncol 2001; 19:420-424.

97. Summers KE, Davies KE, Mattews J et al. The relative role of peripheral blood and bone marrow for monitoring molecular evidence of disease in follicular lymphoma by quantitative real-time polymerase chain reaction.Br J Haematol. 2002; 118:563-566

98. Schmitt C, Balogh B, Grundt A et al. The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: Occurence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. Leukemia Reseach 2006; 30:745-750.

99. Dolken L, Schuler F et al. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. Biotechniques 1998; 25:1058-1064.

100. Cotter FE, Price C et al. Direct sequencing of 14q+ and 18q- chromosome junctions at the MBR and MCR revealing clustering within the MBR in follicular lymphoma. Ann Oncol 1991; 2:93-97.

101. Roulland S, Lebailly P, Roussel G, Briand M et al. Bcl-2/JH Translocation in Peripheral Blood Lymphocytes of Unexposed Individuals; Lack of Seasonal Variations in Frequency and Mollecular Features. Int J Cancer 2003; 104:695-698.

102. Price CG, Tuszynski A et al. Detection of additional JH/BCL-2 translocations in follicular lymphoma. Leukemia 1991; 5:548-554.

103. Rosenblum MD, Drobyski WR et al. Cocnurrent presence of both patient and donor t(14;18) in a follicular lymphoma patient after undergoing allgeneic BMT: implications for minimal residual disease detection post-transplant. Bone Marrow Transplantation 2003; 31:947-949.

104. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA BCL-2 translocation frequency rises with age in humans. Proc.Natl.Acad.Sci.1994; 91:8910-8914.

105. Pappa VI, Wilkes S, Salam A, Young BD, Lister TA and Rohatiner AZS Use of the polymerase chain reaction and direct sequencing analysis to detect cells with t(14;18) in autologous bone marrow from patients with follicular lymphoma, before and after in vitro treatment. Bone Marrow Transplantation 1998; 2:553-558.

106. Johnson A, Brun A et al. Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle centre cell lymphoma of low and high grade: a report from southern Sweeden. Annals of Oncology 1995; 6:789-794.

107. Tilly H, Rossi A et al. Prognostic Value of Chromosomal Abnormalities in Follicular Lymphoma. Blood 1994; 84:1043-1049.

108. Pezzela F, Jones M et al. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. Br J Cancer 1992; 65:87-89.

109. Montoto S, López-Guillermo A, Colomer D,, et al.Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. Leukemia and lymphoma 2003; 44:71-76.

110. Amakawa R, Fukuhara S, Ohno H et al. Involvement of the Bcl-2 gene in Japanese follicular lymphoma. Blood 1989; 73: 787-791.

111. Takechi M, Tanaka K, Hashimoto T et al. Cytogenetic, molecular biological and clinical study of B-cell lymphomas with 14;18 translocation in Japanese patients. Leukemia 1991; 5:1069-1075.

112. Lancry L, Roulland S, Roué G, Mossafa H et al. No BCL-2 protein over expression but BCL-2/IgH rearrangemetns in B cells of patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. The Hematology Journal 2001; 2:228-233.

113. Shih LY, Liang DC et al. Non-Hodgkin's lymphomas in Asia. Hematol/Oncol Clin N Am 1991; 5:983-1001.

114. Haluska FG, Tsijumoto Y, Russo G et al. Molecular genetics of lymphoid tumorigenesis. Prog nucl Acid Res Molec biol 1989; 36:269-280.

115. Segel MJ, Paltiel O, Zimran A et.al. Geographic Variance in the Frequency of the t(14;18) Translocation in Follicular Lymphoma: An Israeli Series Compared to the World Literature. Blood Cells, Molecules, and Diseases 1998; 24:62-72.

116. Yasukawa M, Bando S, Sada E et al. Low frequency of BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals. Blood 2001; 98:486-488.

117. Leone PE, Pérez CJ, Morillo S et al. Low incidence of follicular lymphoma and t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction analysis: observation on Ecuadorian patients. Cancer Genetics and Cytogenetic 2002; 137:72-74.

118. Anderson JR, Armitage JO et al. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geografic locations. Ann Oncol 1998; 9:717-720.

119. Gelb AB, Rouse RV et al. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B lineage non-Hodgkin's lymphomas. American Journal of Clinical Pathology; 102:825-834.

120. Macintyre E, Willerford D et al. Non-Hodgkin's Lymphoma: molecular features of B Cell Lymphoma. Educational Program Book of the ASH. San Francisco 2000:180-204.

121. Skinnider BF, Horsman DE et al. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. Hum Pathol 1999; 30:803-808.

122. Akiko T, Ikuo M et al. Interphase detection of immunoglobulin heavy chain gene translocations with specific oncogene loci in 173 patients with B-cell lymphoma. Cancer Genet Cytogenet 2001; 129:1-9.

123. Vaandrager J, Schuuring E, Raap T, Kleiverda K, Kluin P Interphase FISH Detection of BCL-2 Rearangement in Follicular Lymphoma Using Breakpoint-Flanking Probes. Genes, Chromosomes and Cancer 2000; 27:85-94.

124. Godon A, Moreau A, Talmant P, Baranger-Papot L. et al. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. Leukemia 2003; 17:255-259.

125. Fan YS, Rizkalla K Comprehensive cytogenetic analysis including mluticolor spectral karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization in lymphoma diagnosis: a summary of 154 cases. Cancer Genetics and Cytogenetic 2003; 143:73-79.

126. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q et al. The BCL-6 protooncogene controls germinal-centre formation and Th-2-type inflammation. Nat Genet 1997; 16: 161-170.

127. Yamochi T, Kaneita Y et al. Adenovirus mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-X. Oncogene 1999; 18:487-494.

128. Albagli O, Lantione D et al. Overexpressed BCL-6 oncoprotein triggers apoposis, delays S phase progression and associates with replication foci. Oncogene 1999; 18:5063-5075.

129. Kumagai T, Miki T et al. The protooncogene Bcl-6 inhibits apoptotic cell death in differentiation-induced mouse myogenic cells. Oncogene 1999; 18:467-475.

130. Jardin F, Gualard P, Buchonnet G, Contentin N et al. Follicular lymphoma without t(14;18) rearrangements: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. Leukemia 2002; 16:2309-2317.

131. Oshima A, Miuta I, hashimoto K et al. Rearrangements of the BCL-6 gene and chromosome aberrations affecting 3q27 in 54 patients with non-hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 1997; 27:329-334.

132. Bosga-Bouwet AG, van Imhoff GW, Boonstra R et al. Follicular Lymohoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. Blood 2003; 101:1149-1154.

133. Muramatsu M, Akasaka T et al. Rearrangement of the BCL-6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. Leukemia 1997; 11 (Suppl.3):318-320.

134. Offit K, Louie DC et al. BCL-6 gene rearrangements and other cytogenetic abnormalities in diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Lymphoma 1995; 20:85-89.

135. Cerretini R, Noriega MF, Narbaitz M et al. New chromosome abnormalities and lack of BCL-6 gene rearangements in Argentinean diffuse large B-cell lymphomas. Eur J Haem 2006; 76:284-293.

136. Ott G, Katzenberger t et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. Blood 2002; 99:3806-3812.

137. Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. Br J Heamatol 2003; 120:424-433.

138. Gribben JG, Neuberg K et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. Blood 1993; 81:3449-3457.

139. Corradini P, Astolfi M et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. Blood 1997; 89:724-731.

140. Negrin RS, Kiem HP et al. Use of polymerase chain reaction to monitor the effectivness of ex vivo tumor cell purging. Blood 1991; 77:654-660.

141. Horsman DE, Gascoyne RD et al. Comparison of cytogenetic analysis, Southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. Am J Clin Pathol 1995;103:472-478.

142. Johnson PW, Swinbank K et al. Variability of polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicentre study. Ann Oncol 1999; 10:1349-1354.

143. Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA et al. FISH Is Superior to PCR in Detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in Follicular Lymphoma Using Paraffin-Embeded Tissue Samples. Am J Clin Pathol 2005; 124:421-429.

144. Hirt C, Dölken G Quantitative detection of t(14;18)-positive cells in patients with follicular lymphoma before and after autologous bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation 2000; 25:419-426.

145. Pichert G, Schmitz SFH, Hess U et al. Weekly x 4 induction therapy with the anti-CD antibody rituximab: effect on circulating t(14;18) + follicular lymphoma cells. Clin Lymphoma 2001;1:283-297.

146. Foran JM, Gupta RK, Cunningmam D et.al. A UK multicentre phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. Br J Heamatol 1999; 109:81-88.

147. Chamberlain JS, Gibbs RA et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids res 1988; 16:11141-11156.

148. Shubber AP, Skoletsky J et al. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. Hum Mol Genet 1993; 2:153-158.

149. Crisan D. Molecular diagnostic testing for derermination of myeloid lineage in acute leukemias. Ann Clin Lab Sci 1994; 24:355-363.

150. Markoulatos P, Samara V et al. Development of a quadriplex polymerase chain reaction for human cytomegalovirus. J Clin Lab Anal 1999; 13:99-105.

151. Henegariu O, Heerema Na et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Bio Techniques 1997; 23: 504-511.

152. Meier VS, Rufle A, Gudat F. Simultaneous Evaluation of T- and B-Cell Clonality, t(11;14) adn t(14;18), in a Single Reaction by a Four Color Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay and Automated High-Resolution Fragment Analysis. Am J Pathol 2001; 159:2031-2043.

153. Sanchez-Vega B, Vega F, Medeiros LJ et al. Quantification of bcl-2/JH Fusion Sequence and a Control Gene by Multiplex Real-Time PCR Coupled with Automated Amplicon Sizing by Capillary Electrophoresis. Journal of Molecular Diagnostics 2002; 4:223-229.

154. Darby AJ, Lanham S et al. Variability of quantitative polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicenter study. Heamatologica/the hematology journal 2005; 90: 1706-1707.

155. Barrans Sl, Evans PA et al. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. J Mol Diagn.2003; 5:168-175.

156. Hirose Y, Masaki Y et al. Fluorescence in situ hybridization detection of chromosome IgH/bcl-2 translocations from paraffin-embedded tissue: evaluation of follicular lymphoma. Int J Hematol.2003; 78:154-159.

157. Matsumoto Y, Nomura K et al. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. Cancer Cytogenet.2004; 150:22-26.

158. Gribben JG, Neuberg D, Barber M et al. Detection of Residual Lymphoma Cells by Polymerase Chain Reaction in Peripheral Blood Is Significantly Less Predictive for Relapse Than Detection in Bone Marrow. Blood 1994; 83:3800-3807.

159. Janíková –Obořilová A, Mayer J, Dvořáková D et al. Praktické aspekty a reálný klinický význam sledování t(14;18) v periferní krvi pacientů s folikulárním lymfomem. Čas Lék Česk. 2007; 146:374-381

160. López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin et al. The Clinical Significance of Molecular Response in Indolent Follicular Lymphomas. Blood 1998; 91:2955-2960.

161. Summers KE, Davies AJ, Matthews J, Jenner MJ et al. The relative fole of peripheral blood and bone marrow for monitoring molecualr evidence fo disease in follicular lymphoma by quantitative real-time polymerase chain raaction. Br J Heamatol 2002; 118:563-566.

162. Bowman A, Jones D, Mederois J Quantitative PCR Detection of t(14;18) bcl-2/JH Fusion Sequences in Follicular Lymphoma Patients. Comparison of Peripheral Blood and Bone Marrow Aspirate Samples Journal of Molecular Diagnostics 2004; 6:396-401.

163. Apostolidis J, Gupta RK, Granzelias D et al. High-Dose Therapy With Autologous Bone Marrow Support as Consolidation of Remission in Follicular Lymphoma: Long-Term Clinical and Molecular Follow-Up. J Clin Oncol 2000; 18:527-536.

164. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. Blood 2002; 99:856-862.

165. Obořilová A, Dvořáková D, Mayer J: Translokace t(14;18) a její význam ve sledování minimální zbytkové nemoci u folikulárního lymfomu. Transfúze a hematologie dnes 2004; 2:51-61.

166. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLauglin P, Smith T et al. Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-gree survival in indolent follicular lymphoma: Update of the MDACC series. Annals of Oncology 2000; 11(Suppl.1):137-140.

167. Tsimberidou AM, McLaughlin P, Younes A, Rodriguez MA et al. Fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone (FND) compared with alternating triple therapy

(ATT) regimen in patients with stage IV indolent lymphoma. Blood 2002; 100:4351-4357.

168. Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin's lymphoma. Blood 2005; 105:3428-3433.

169. Soubeyran P, Hostein I, Debled M et al. Evolution of BCL-2/IgH hybrid gene RNA expression during treatment of T(14;18)-bearing follicular lymphomas. British Journal of Cancer 199; 81:860-869.

170. Lambrechts AC, Hupkes PE et al. Clinical Significance of t(14;18) – Positive Cells in the Circulation of Patients With Stage III or IV Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma During First Remission. J Clin Oncol 1994; 12:1541-1546.

171. Driilenburg P et al. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemenation Blood 2000; 95:1900-1910.

172. Ha Ch, Cabanillas F, Lee M et al. Seriál Determination of the bcl-2 Gene in the Bone Marrow and Peripheral Blood after Central Lymphatic Irradiation for Stages I-III Follicular Lymphoma: A Preliminary Report. Clinical Cancer Research 1997; 3:215-219.

173. Philip T, Armitage JO et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high grade non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1987; 316:1493-1498.

174. Rohatiner AZ, Johnson PW, Price CG et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. J Clin Oncol 1994; 12:1177-1184.

175. Freedman AS, Neuberg D et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. Blood 1999; 94:3325-3333.

176. Bierman PJ, Vose JM et al. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 1997; 15:445-450.

177. Freedman AS, Gribben JG et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. Blood 1996; 88:2780-2786.

178. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. Blood 2001; 97:404-409.

179. Tarella C, Caracciolo D et al. Long-term follow-up of advanced-stage-low-grade lymphoma patients treated upfront with high-dose sequential chemotherapy and autograft. Leukamia 2000; 14:740-747.

180. Mahé B, Milpied N, Mellerin MP et al. PCR detection of residual Bcl-2/IgH-positive cells after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation is a prognostic factor for event-free survival in patients with low-grade follicular non-Hodgkin´s lymphoma. Bone Marrow Transplantation 2003; 31:467-473.

181. Sharp JG, Joshi SS et al. Significance of detection of occult non-Hodgkin´s lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by culture technique. Blood 1992; 79:1074-1078.

182. Gribben JG, Freedman AS et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. N Eng J Med 1991; 325:1525-1531.

183. Freedman AS, Saporito L et al. Adhesion of follicular lymphoma cells to lymphoid germinal centers – a potential mechanism of tumor cell homing following autologous transplantation. Leuk Lymphoma 1994 Mar;13(1-2):47-52.

184. Takvorian T, Cannelos GP et al. Prolonged disease-free survival after autologous bone-marrow transplantation in patients with non-Hodgkin´s lymphoma with a poor prognosis. N Eng J Med.1987; 316:1499-1505.

185. Hardingham JE, Kotasek D et al. Significance of molecular marker-positive cells after autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for non-Hodgkin´s lymphoma. J Clin Oncol 1995; 13:1073-1079.

186. Bensinger W. Should we purge? Bone Marrow Transplant.1998; 21:113-115.

187. Ladetto M, Corradini P, Vallet S et al. High rate of clinical and molecular remissions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy and autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by the Gruppo Italiano Trapianto Middolo Osseo (GIMTO). Blood 2002; 100:1559-1564.

188. Magni M, Di Nicola M, Devizzi L et al. Successful in vivo purging of CD34-containing peripheral blood harvests in mantle cell and indolent lymphoma: evidence for a role of both chemotherapy and rituximab infusion. Blood 2000; 96:864-869.

189. Tóthová E, Kafková A, Guman T et al. Efficiency of in vivo purging with autologous stem cell transplantation and monoclonal antibody in B-cell lymphomas. Neoplasma 2003; 50:22-25.

190. Chopra R, Goldstone AH et al. Autologous versus allogeneic bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case controlled analysis of the European bone marrow transplant group registry data. J Clin Oncol 1992; 10:1690-1695.

191. Ratanatharathorn V, Uberti J et al. Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1994; 84:1050-1055.

192. Juckett M, Rowlings P et al. T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation for high-risk non-Hodgkin's lymphoma: clinical and molecular follow up. Bone Marrow Transplant 1998; 21:893-899.

193. Mitterbauer M, Neumeister P, Kalhs P, Brugger S et al. Long-term clinical and molecular remission after allogeneic stem cell transplantation (SCT) in patients with poor prognosis non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia 2001; 15:635-641.

194. Masada R, Teshima T et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of refractory follicular lymphoma. Intern Med 1998; 37:1050-1054.

195. Meijerink JPP, Goverde GJ et al. Quantification of follicular non-Hodgkin's lymphoma cells carrying t(14;18) in a patient before and after allogeneic bone marrow transplantation. Annals of Oncology 1994; 5(suppl.1): 43-45.

196. Press OW, Appelbaum F et al. Monoclonal antibody anti CD20 serotherapy of human B cell lymphomas. Blood 1987; 69:584-591.

197. Reff ME, Carner K et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 1994; 83:435-445.

198. Anderson KC, Bates MP et al. Expression of human B-cell associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation. Blood 1984; 63:1424-1433.

199. Czuczman M, Grillo-Lopez A et al. Rituximab clearance of BCL-2 from peripheral blood and bone marrow from patients with relapsed low-grade follicular lymphoma. Proc Am Assoc Cancer Res 1999; 40:719 (Abstr 4748).

200. Maloney DG, Grillo-Lopez et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1997; 90:2188-2195.

201. Piro L, White CA et al. Rituxan (rituximab, IDEC C2B8): interim analysis phase II study on once weekly times 8 dosing in patients with relapsed low-grade or follicular non-Hodgkin´s lymphoma. Blood 1997; 90:510a.

202. Cohen SB Retreatment with Rituxan (rituximab, IDEC C2B8) have significant efficacy, do not cause harm, and are a viable minimally toxic alternative in relapsed or refractory non-Hodgkin´s lymphoma. Blood 1997; 90:509a.

203. Rogers J, Jackson J, Rosenberg J et al. Clearance of bcl-2 t(14;18) from peripheral blood and bone marrow in patients with relapsed low-grade or follicular lymphoma following single-agent therapy with the chimaeric anti-CD20 antibody IDEC-C2B8. Annals of Oncology 1996; 7:108a.

204. Czuczman MS, Grillo-López AJ, McLauglin P, White CA et at. Clearing of cells bearing the bcl-2 [t(14;18)] translocation from blood and marrow of patients treated with rituximab alone or in combination with CHOP chemotherapy. Annals of Oncology 2001; 12:109-114.

205. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. J Clin Oncol 1999; 17: 1244. Erratum in: J Clin Oncol 2000; 18: 2351.

206. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 53:457-481.

207. Colombat P, Salles G, Brousse N et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. Blood 2001; 97:101-106.

208. Mandigers CM, Meijerink PP, Mensink EM et al. Lack fo correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. Blood 2001; 98:940-944.

7.2. Seznam použitých zkratek

AA IPI – age adjusted international prognostic index (věkově upravený mezinárodní prognostický index)
ADCC – cytotoxicita závislá na protilátkách
AML – akutní myeloidní leukémie
ASCT – autologous stem cell transplantation
ATT – alternative tripple therapy
BCL-2 gen – B-cell leukemia/lymphoma 2 gen
CD – cluster of differenciation
CLL – chronická B-lymfocytární leukémie
CR – kompletní remise
DNA – deoxyribonucleotid acid (deoxyribonukleová kyselina)
DLBCL –diffuse large B-cell lymphoma (difúzní B-velkobuněčný lymfom)
EFS – event free survival (období bez události)
FLIPI – Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FISH – fluorescenční in situ hybridizace
FL – folikulární lymfom
HLA – human leukocyte antigens
CHT - chemoterapie
ICR – intermediate cluster region
IgH – těžký řetězec imunoglobulinu
LDH – laktát dehydrogenáza
LD-PCR – long distance polymerázová řetězová reakce
MALT lymfom – mucosa associated lymphoma tissue lymphoma
MBR – major breakpoint region
MDS – myelodysplastický syndrom
Mcr – minor cluster region
MRN – minimální reziduální nemoc
NHL - nehodgkinův lymfom
OS – overall survival (celkové přežití)
PCR – polymerázová řetězová reakce
PD – progresivní onemocnění

PFS – progression free survival (období bez progrese)

PR – parciální remise

PS – performance status

QRT-PCT – kvantitativní real time polymerázová řetězová reakce

R-CHT – rituximab + chemoterapie

RT –radioterapie

SD – stabilní onemocnění

SKY – vícebarevné spektrální karyotypování

TLNI –total lymph node irradiation

TRM – peritransplantační mortalita

uCR – nepotvrzená kompletní remise

VCR – variant cluster region

WHO – World Health Organization

8. Poděkování

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

Závěrem bych rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr.Jaroslavu Malému, CSc., za podporu při práci nad tímto projektem, dále PharmDr.Martinu Beránkovi, PhD. z Ústavu klinické biochemite a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové a ing.Daně Dvořákové, CSc. z Ústavu molekulární biologie a diagnostiky při Interní hematoonkologické klinice, Fakultní nemocnici v Brně, za vyšetřování vzorků periferní krve a kostní dřeně pomocí molekulárně biologických metod. V neposlední řadě mé díky patří doc.Karlu Dědičovi a Dr.Petře Kašparové z Fingerlandova ústavu patologie FN Hradec Králové za vyšetřování trepanobioptických vzorků kostní dřeně na přítomnost bcl-2 proteinu a ing.Josefu Bukačovi z katedry lékařské biofyziky a biostatistiky za pomoc při statistickém zpracování práce.

MUDr.David Belada

II.interní klinika – oddělení klinické hematologie

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Sokolská 581, Hradec Králové 5, 500 05

david.belada@seznam.cz