

# Je možné pomocí časně molekulární odpovědi a její kinetiky předpovědět další osud pacientů s chronickou myeloidní leukémií?

Is it possible to predict the fate of chronic myeloid leukaemia patients by assessing early molecular response and its kinetics?

Hornák T., Mayer J., Žáčková D.

Interní, hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

**SOUHRN:** Management a terapie pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) doznaly za 20 let velkých změn. Zlatým standardem měření odpovědi na léčbu inhibitory tyrozin kináz (TKI) se stala metoda kvantitativní RT-PCR ke stanovení hladiny transkriptu *BCR-ABL1*. V zájmu sjednocení metodiky měření a její spolehlivosti došlo k mezinárodní harmonizaci interpretace výsledků vyšetření formou jejich vyjádření na mezinárodní škále a přidělování konverzního faktoru jednotlivým laboratorům na základě srovnání s referenčním pracovištěm. Časná molekulární odpověď na léčbu má významný vliv na průběh onemocnění a selektuje pacienty s dobrou prognózou. Část pacientů, kteří časně odpovědi nedosáhnou, má na další průběh i tak dobré vyhlídky. Pro jejich vyčlenění z rizikové skupiny je možno zohlednit kinetiku časněho poklesu hladiny transkriptu. Koncept tzv. „*halving time*“ naznačuje vysokou míru úspěšnosti predikce citlivosti nemoci vůči nasazené terapii. V éře dlouhodobé terapie TKI je pořád častěji skloňovaným tématem možnost pokusu o remisi bez léčby (*treatment-free remission* – TFR). Tato strategie přináší možnost přerušit léčbu bez rekurence onemocnění, snížit její nežádoucí účinky a nezanedbatelnou ekonomickou zátěž systému. Identifikovat pacienty, u kterých lze tohoto cíle dlouhodobě dosáhnout, se však dodnes přesně nedaří. Stabilní TFR navíc udrží jen menšina pacientů. Volba léčebné strategie se tak může ubírat i snahou o maximální možnou redukci dávky TKI při trvalé léčebné odpovědi. CML není vzorem jen pro cílenou léčbu a její úspěšnost, ale je ideální i pro matematické modelování onkologického onemocnění, mimo jiné i pro jednoduchost vyšetření nádorové nálože z periferní krve a její sledování v čase. Tímto lze do modelů zadávat jednoduše získaná a přesná data. Pomocí modelů jsme schopni simulovat podstatu vzniku CML z leukemické kmenové buňky, vliv TKI na tyto buňky, různé dávkovací režimy, pokus o TFR či odpověď imunitního systému na přítomnost nemoci. Následující text shrnuje přehled principů molekulárního měření léčebné odpovědi, vliv časně odpovědi a její kinetiky na prognózu pacientů a matematické modely CML v organismu.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** chronická myeloidní leukémie – molekulární sledování – časná molekulární odpověď – *halving time* – matematické modely – remise bez léčby

**SUMMARY:** Management and therapy of patients with chronic myeloid leukaemia (CML) has changed significantly over the past twenty years. Quantitative RT-PCR detection of the *BCR-ABL1* transcript level has become the gold standard for evaluating response to tyrosine kinase inhibitors (TKI) treatment. Demand for standardization of methodologies resulted in the international harmonisation of test result interpretation by expressing these on an international scale and assigning conversion factors to individual laboratories based on their comparison with reference sites. Early molecular response to treatment significantly influences the disease course and selects patients with good prognosis. Some of the patients who do not experience an early response still have good prospects in terms of disease course, as it is possible to take into consideration the kinetics of transcript level early decrease in order to exclude the high-risk group. The “*halving time*” concept indicates a high success rate for predicting disease sensitivity to the treatment given. In the era of long-term TKI therapy, attempts at a treatment-free remission (TFR) are being cited more frequently. This strategy involves the possibility of interrupting treatment without disease recurrence, decreasing adverse effects and the economic burden. Even today, identification of patients who are able to achieve this goal is hard and stable TFR is achieved only in a minority of patients. Treatment strategy may thus involve opting for a maximum possible reduction of TKI dose while still preserving treatment response. CML is not only a paradigm because of targeted treatment and its success rate but also because of its amenability for mathematical modelling of an oncological disease, given the simplicity of tumour load examination from peripheral blood and its real-time observation. This allows for easily acquired accurate data to be entered into the models. Using such models, we can simulate the origin of CML from the leukemic stem cell, TKI influence on these cells, various dosage regimens, attempts at TFR or the immune system response to presence of the disease. The following paper provides an overview of the principles of molecular measurement of treatment response, the consequences of early response and its kinetics on patient prognosis, and mathematical models of CML in the organism.

**KEY WORDS:** chronic myeloid leukaemia – molecular monitoring – early molecular response – halving time – mathematical models – treatment-free remission

## ÚVOD

Když byl v roce 2001 schválen do klinické praxe imatinib jako první inhibitor tyrozinkináz (TKI), bylo novým a velmi odvážným cílem terapie chronické myeloidní leukemie (CML) zastavit progresi nemoci do blastické fáze, a zvrátit tak do té doby neodvratitelný osud většiny pacientů [1]. Poté byly uvedeny další, potentnější TKI, díky nimž jsme dnes úspěšní i v léčbě pacientů s rezistentním onemocněním. Chronickou terapií TKI dokážeme u majoritní části pacientů držet CML dlouhodobě pod kontrolou a jejich celkové přežití (*overall survival* – OS) se blíží OS běžné populace. Novou odvážnou myšlenkou se v tomto prostředí stal cíl terapie zvaný remise bez léčby (*treatment-free remission* – TFR). TFR je stav, kdy je pacient schopný léčbu TKI přerušit bez následného relapsu onemocnění. V dosud provedených a publikovaných studiích se úspěšnost pokusů o TFR u vybraných pacientů pohybuje kolem 50–60 %. Způsoby, jak identifikovat pacienty s vyšší šancí úspěšnosti TFR, by tak v této oblasti byly poměrně vítaným příspěvkem [2–7]. Viditelná je také snaha o vytvoření prediktivního matematického modelu [8–22]. Víze, že po shromáždění určitých údajů o pacientovi a jeho nemoci budeme schopni určit vhodný TKI a jeho dávku, predikovat odpověď na léčbu a nutnost délky terapie před možností vysazení k dosažení dlouhodobé TFR, je zatím pouze nedosažitelným abstraktem.

Sledování odpovědi na léčbu je samostatnou kapitolou v „dějinách“ léčby CML. V počátcích jsme úspěšnost léčby mohli sledovat hlavně díky cytogenetickému vyšetření a identifikaci podílu Ph+ buněk v kostní dřeni pacientů [23]. Zavedení kvantitativní *real-time* polymerázové řetězcové reakce s využitím reverzní transkriptázy (RT-qPCR), v dnešní době zlatého a jediného doporučovaného standardu měření odpovědi na léčbu TKI, s sebou neslo i nutnost standardizace výsledků mezi jednotlivými laboratořemi ve formě zavedení mezinárodní škály (*international scale* – IS) a konverzního faktoru (*conversion factor* – CF) [24–28]. Díky RT-qPCR dokážeme kvantifikovat transkripční aktivitu buněk, tedy množství mRNA. Dnes se do popředí dostávají také modernější metody jako např. kvantifikace *BCR-ABL1* přímo v DNA buněk [29].

Od zavedení TKI a sledování vývoje odpovědi na léčbu (zpočátku hlavně na cytogenetické úrovni) víme, že snižování počtu Ph+ buněk v krvi pacientů má pozitivní vliv na prognózu pacientů [23]. Postupem času se těžiště sledování léčebné odpovědi posunulo na molekulární úroveň a po ustálení, standardizaci RT-qPCR a průkazu významu dosažení poklesu hladiny transkriptů pod určitou úroveň bylo možné pro další osud pacientů stanovit cílové hodnoty poklesu transkriptu *BCR-ABL1* v uzlových bodech terapie. Podle absolutní hodnoty vztažené k mezinárodní škále dosažené v určitém čase od zahájení te-

rapie tedy dnes hodnotíme léčebnou odpověď na optimální, varování a selhání terapie (tab. 1) [3,30]. Víme také, že prognóza pacientů je lepší, pokud je dosaženo časné molekulární odpovědi (*early molecular response* – EMR) [31–40]. Pravidelné a přesné měření v uzlových bodech je tedy absolutním základem úspěšnosti léčby. Novější data dokazují, že přínos může představovat i měření dynamiky onemocnění v čase [41–46]. Hledání přesnějších parametrů s cílem optimalizace léčby pacientů s CML však pořád pokračuje.

V následujícím textu je ve formě přehledu analyzována problematika principu měření léčebné odpovědi na molekulární úrovni při léčbě TKI a jeho mezinárodní standardizace a téma vlivu časné molekulární odpovědi dosažované v uzlových bodech či vyjádřené formou zhodnocení kinetiky poklesu hladiny transkriptů v úvodu léčby na prognózu. Pozornost je věnovaná i vztahu těchto parametrů vůči úspěšnosti TFR a není opomenuto ani matematické modelování dynamiky CML na základě molekulárního měření.

## PRINCIPY MOLEKULÁRNÍHO SLEDOVÁNÍ A STANDARDIZACE MĚŘENÍ

Od zavedení TKI do klinické praxe výrazně vzrostla šance pacientů na dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (*complete cytogenetic response* – CCyR), tedy nepřítomnosti Ph+ buněk ve vzorku kostní dřeni vyšetřeném kon-

**Tab. 1. Hodnocení léčebné odpovědi v uzlových bodech vyjádřeno v procentech *BCR-ABL1*<sup>15</sup>. Upraveno dle doporučení ELN 2020 [3].**

	Optimální	Varování	Selhání
vstupně	nestanoveno/nelze	vysoce rizikové ACA, vysoké ELTS skóre	nestanoveno/nelze
3. měsíc	≤ 10 %	> 10 %	> 10 % pokud potvrzeno za 1–3 měsíce
6. měsíc	≤ 1 %	> 1–10 %	> 10 %
12. měsíc	≤ 0,1 %	> 0,1–1 %	> 1 %
kdykoliv	≤ 0,1 %	> 0,1–1 %	> 1 %, rezistentní mutace, vysoce rizikové ACA

ACA – přidatné chromozomální abnormality (*additional chromosome abnormalities*), ELTS – EUTOS skóre dlouhodobého přežití (*EUTOS long term survival score*)

**Tab. 2. Množství transkriptů kontrolního genu ke stanovení molekulární odpovědi. Upraveno dle doporučení ELN 2020 [3].**

Molekulární odpověď	MMR	MR4	MR4.5	MR5
Minimální množství transkriptů referenčního genu	10 000 <i>ABL1</i> 24 000 <i>GUS</i>	10 000 <i>ABL1</i> 24 000 <i>GUS</i>	32 000 <i>ABL1</i> 77 000 <i>GUS</i>	100 000 <i>ABL1</i> 240 000 <i>GUSB</i>
Hladina transkriptu <i>BCR-ABL1</i> <sup>15</sup>	≤ 0,1 %	≤ 0,01 %	≤ 0,0032 %	≤ 0,001 %

*MMR* – velká molekulární odpověď (*major molecular response*)

venční cytogenetickou analýzou karyotypu. Při doporučeném počtu 20 vyšetřených mitóz je ale jasné, že reziduální leukemické kmenové buňky unikají citlivosti tohoto vyšetření, a výsledek je tak *de facto* falešně negativní. Proto vznikla potřeba přesnějšího monitorování zbytkové nemoci. Metoda RT-qPCR, která monitoruje přímo množství transkriptu *BCR-ABL1* (Q *BCR-ABL1*), nabízí vyšší citlivost s možností identifikace 1 leukemické buňky mezi 10<sup>5</sup> buněk. Vyšetření lze provádět z periferní krve, což také snižuje invazivitu pravidelného monitorování. Naprostá většina pacientů má jeden ze dvou typů transkriptu (e13a2 nebo e14a2), které se navíc liší pouze jedním exonem genu *BCR* [47]. Při tomto typu vyšetření proto není nutno používat pacient-specifické primery. Výsledkem je poměr hodnot transkriptu *BCR-ABL1* ke zvolenému kontrolnímu genu [25]. Volba vhodného kontrolního genu sehrává významnou roli. Jeho výběr je nutno zohlednit při interpretaci výsledků. Ideální kontrolní gen musí mít stejnou či podobnou hladinu stability a exprese jako fúzní gen *BCR-ABL1*. Dnes používanými jsou např. *ABL1*, *BCR*, *GUS* [48].

V zájmu lepšího porovnávání výsledků mezi jednotlivými pracovními skupinami a laboratořemi byla v roce 2005 navržena standardizace výsledků na mezinárodní škále (*international scale* – IS) ve smyslu udávání logaritmicke redukce ze standardizované hodnoty. Touto hodnotou je medián Q *BCR-ABL1* 30 vstupních vzorků pacientů s CML v chronické fázi ze studie IRIS [26]. Názvosloví hodnot molekulární odpovědi (*molecular response* – MR) se vyvíjelo a opakovaně měnilo v čase. Aktuálně jsou odpovědi udávány s čís-

lem odpovídajícím logaritmicke redukci standardizované hodnoty (tab. 2). Hodnota MR3 odpovídá hladině transkriptů *BCR-ABL1* ≤ 0,1 %<sup>15</sup>. Ve stejném duchu pak popisujeme MR4, MR4.5 a MR5. Velká molekulární odpověď (*major molecular response* – MMR) odpovídá hodnotě MR3 a hodnoty MR4 a vyšší jsou označovány jako hluboká molekulární odpověď (*deep molecular response* – DMR). Termín kompletní molekulární odpověď (*complete molecular response* – CMR) se k označení nedetekovatelné hladiny transkriptu dnes již nepoužívá, nebo se použije výraz molekulárně nedetekovatelná leukemie (*molecularly undetectable leukemia*). Časná molekulární odpověď (*early molecular response* – EMR) je definována jako hladina transkriptů *BCR-ABL1* ≤ 10 % IS ve 3. měsíci léčby.

Zavedení IS zjednodušilo stanovení míry léčebné odpovědi v rámci jedné laboratoře. Vzhledem k různé technice, metodice provedení a volbě kontrolního genu ale zůstala nedořešena variabilita výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. I zde došlo k harmonizaci postupu díky zavedení konverzních faktorů přidělovaných jednotlivým laboratořím na základě porovnávání jejich výsledků se závěry z příslušné referenční laboratoře. Protože původní návrh harmonizace pochází od australské pracovní skupiny, byla první referenční laboratoř ustanovena v Adelaide [24]. Projekt The European Treatment and Outcome Study (EUTOS) dal následně vzniknout síti referenčních laboratoř v Evropě za účelem zjednodušení přidělování CF lokálním laboratořím. Po přidělení CF by měla laboratoř procházet opětovnou re-evaluací v pravidelných časových intervalech nebo kdykoli

při změně v procesu laboratorního vyšetření [28]. Velmi aktivně jsou do procesu mezinárodní harmonizace zapojeny i laboratoře v České republice [49].

Výsledkem vyšetření metodou RT-qPCR je množství mRNA, které současně odráží míru aktivity transkripce *BCR-ABL1* v poměru ke kontrolnímu genu v buňkách a celkový počet leukemických buněk ve vzorku. Jak bylo uvedeno výše, na konečném výsledku se může podílet velké množství faktorů. I přes standardizaci postupů a harmonizaci výsledků mezi jednotlivými laboratořemi mají tyto faktory potenciál významně ovlivnit výsledek vyšetření. Se zaváděním stále modernějších metod je možné přímo detekovat fúzní gen v DNA. DNA molekula jedné leukemické buňky obsahuje v naprosté většině přesně 1 kopii fúzního genu *BCR-ABL1* a 2 kopie kontrolního genu. Tímto způsobem lze určit přesný počet leukemických buněk ve vzorku. Za nevýhodu může být považována vyšší technická náročnost tohoto vyšetření. Ve fúzním genu *BCR-ABL1* se totiž nacházejí introny unikátní pro každého pacienta, které jsou z transkriptu vystřiženy. K dosažení výsledku je potřeba nejdříve stanovit pacient-specifické body zlomu (*break-points*). Pagan et al. porovnávali výsledky RT-qPCR a DNA PCR u pacientů s CML a v prvních 3 měsících terapie pozorovali významně rychlejší pokles *BCR-ABL1*<sup>15</sup> proti *BCR-ABL1* DNA. Po 6 měsících a dále docházelo ke shodě v naměřených hodnotách. Nabízí se vysvětlení, že v prvních 3 měsících nastává deplece leukemických buněk s vysokou aktivitou exprese. Po vymizení buněk s vysokou expresí je poté srovnatelný výsledek poklesu

*BCR-ABL1*<sup>15</sup> proti *BCR-ABL1* DNA vysvětlen snižujícím se počtem leukemických buněk [29]. Tento závěr odpovídá také některým matematickým modelům představeným v dalším textu [14,15,21]. Kombinaci měření zbytkové nemoci v DNA a mRNA lze také využít k predikci dosažení stabilní TFR, jak prokázala Machová Poláková et al. [50].

### MĚŘENÍ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚDI V UZLOVÝCH BODECH A VLIV ČASNÉ ODPOVĚDI NA PROGNÓZU

Ještě před érou standardizace výsledků molekulárního vyšetřování hladiny transkriptů *BCR-ABL1* byl pozorován vztah mezi jejím poklesem a cytogenetickou odpovědí. Merx et al. v roce 2002 ve skupině 101 pacientů, kteří trpěli CML v chronické fázi (*chronic phase* – CP) a byli po selhání interferonu léčeni imatinibem, prokázali, že pokles *Q BCR-ABL1* pod 20 % původní hodnoty po 2 měsících terapie koreluje s šancí na dosažení velké cytogenetické odpovědi (*major cytogenetic response* – MCyR, tj. < 35 % Ph+ buněk) v 6. měsíci léčby [35]. V další studii Wang et al. u 47 pacientů s CML v CP popsali, že u pacientů, u kterých je dosaženo poklesu *Q BCR-ABL1* po 1 měsíci terapie pod 50 % a po 3 měsících pod 10 %, je také větší šance na dosažení MCyR po 6 měsících. Vyšlo najevo, že molekulární odpověď nemá vztah jenom k cytogenetické odpovědi, ale byl prokázán také vliv na parametry přežití. Pacienti, kteří dosáhli zmíněných hladin *BCR-ABL1*, měli lepší výsledky přežití bez progresu (*progression free survival* – PFS) při mediánu sledování 16,5 měsíce [37]. Výsledky v podobném smyslu publikovali i Cortes et al., kdy ve studii u 280 pacientů zjistili, že ti, kteří po 3 měsících léčby imatinibem dosáhli redukce o méně než 1-log, mají po roce terapie menší šanci (55 %) dosáhnout MMR (v té době definované jako *Q BCR-ABL1* ≤ 0,05 %) než ti, kteří dosáhli odpovědi větší než 1-log, resp. 2-log (84, resp. 95 %). Dosažení MMR poté vztáhli k šanci na udržení CCyR a postulovali, že

MMR je pro udržení CCyR stěžejní [51]. Další práce zjistila, že snížení *Q BCR-ABL1* o více než 2-log původní hodnoty mediánu pacientů během CCyR má vysokou prediktivní hodnotu pro přežití bez progresu onemocnění [36].

Po zavedení měření v IS v australské studii Branford et al. porovnávali molekulární odpověď u 28 pacientů ze studie IRIS. Pacienty rozdělili v různých uzlových bodech do 2 skupin: první skupina dosáhla poklesu *Q BCR-ABL1* o víc než 2 log na IS a ve skupině druhé byl pokles menší. Pacienti, kteří dosáhli poklesu > 2 log IS, měli po 24 měsících terapie 100% šanci dosažení MMR – proti 54,2 % pacientů ve druhé skupině. Při stejném měření po 6 měsících terapie mělo šanci na dosažení MMR po 2 letech 86,4 % pacientů s poklesem > 2 log IS a 0 % pacientů s poklesem menším [52]. Tato studie jako první uvažovala o možnosti predikce pozdní odpovědi na základě dosažení EMR v uzlovém bodu 3 měsíců, aby na ni další práce přinášející důkazy o důležitosti EMR pro osud pacientů navázaly.

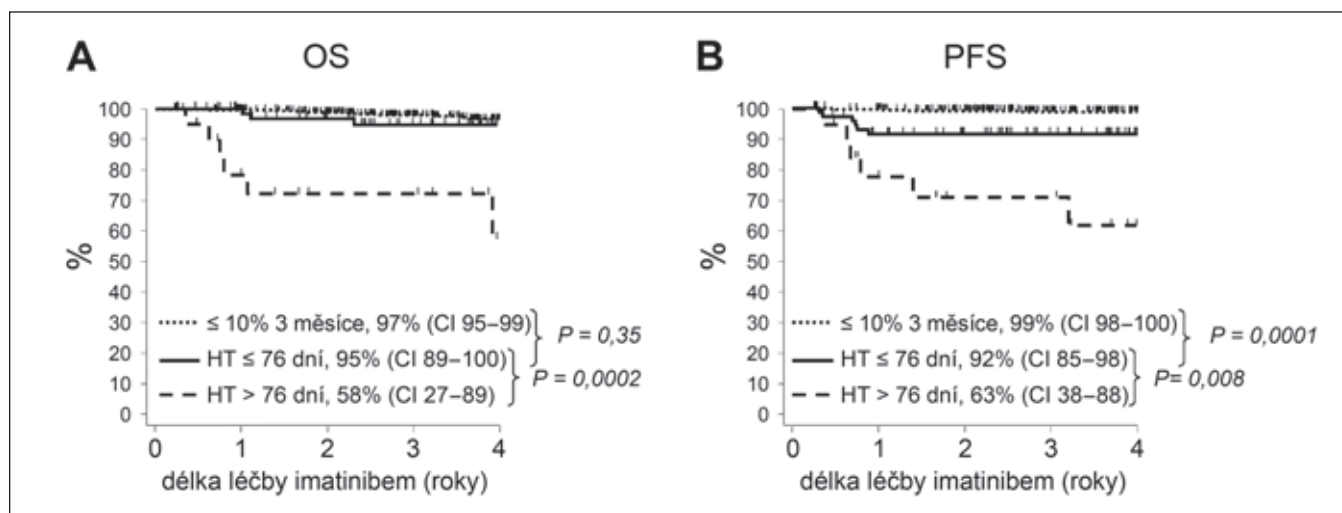
Marin et al. prokázali, že pacienti léčeni imatinibem po 3 měsících terapie s *Q BCR-ABL1* vyšším než 9,84 % dosahují po 8 letech signifikantně nižšího OS než ti, kteří mají pokles pod tuto hodnotu (56,9 vs. 93,3 %). Uplatněním této hodnoty prokázali významné rozdíly i v ostatních parametrech: PFS, přežití bez události (*event-free survival* – EFS), CCyR a CMR. Autoři konstatovali, že hladina *Q BCR-ABL1* po 3 měsících terapie je nejpřesnějším způsobem, jak identifikovat pacienty s vysokým rizikem selhání terapie [38]. Hranice 10 % *Q BCR-ABL1*<sup>15</sup>, tedy redukce o 1 log IS, byla potvrzena jako důležitý prediktivní faktor i dalšími autory [32,33,39]. Ve snaze zlepšit prediktivní hodnotu časné molekulární odpovědi přistoupili někteří autoři ke kombinaci výsledků získaných měřením nejen ve 3., ale i v 6. měsíci léčby. Studie z Hammersmith Hospital prokázala, že inkorporace hodnoty *Q BCR-ABL1* v 6. měsíci k odpovědi ve 3. měsíci nemá vliv na klinické rozhodování. Jinými

slovy jsou šance na dosažení CCyR, PFS i OS analogické v případě, že se vychází pouze z léčebné odpovědi dosažené ve 3. měsíci či z kombinace údajů z 3. a 6. měsíce od zahájení terapie [53]. Další práce pak přinesla pozorování, že i podskupina pacientů, která nedosáhne EMR ve 3. měsíci, ale dosáhne *Q BCR-ABL1* v 6. měsíci ≤ 10 %<sup>15</sup>, má stejně příznivé vyhlídky jako pacienti s EMR. Tak byli identifikováni „méně riziková“ pacienti ve skupině, která nedosáhne EMR [34]. Hanfstein et al. publikovali analogické závěry. Skupina, dosahující po 3 měsících hodnoty ≤ 10 % *Q BCR-ABL1*<sup>15</sup>, měla po 8 letech srovnatelný PFS i OS se skupinou, která této hodnoty dosáhla po 6. měsících. Hodnota ve 3. měsíci však byla o více než polovinu senzitivnější, zatímco hodnota v 6. měsíci zase specifitější. Zohlednění pouze hodnoty v 6. měsíci by vedlo k identifikaci méně rizikových pacientů a méně případů progresu onemocnění [40]. Zjištěné skutečnosti našly svůj odraz v mezinárodních doporučeních pro léčbu CML, kde je hodnota mezi 1–10 % *Q BCR-ABL1*<sup>15</sup> v 6. měsíci terapie hodnocena jako varování, avšak ne jako selhání terapie [3].

### KINETIKA MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚDI A JEJÍ VZTAH K PROGNÓZE ONEMOCNĚNÍ

Z publikovaných výsledků je zřejmé, že pacienti, kteří dosáhnou EMR, mají statisticky lepší prognostické vyhlídky. Skupina pacientů, kteří EMR nedosáhnou, je však značně heterogenní, jak již bylo naznačeno. Jak tedy rozlišit rizikovitost těchto pacientů? Diskutovaným tématem je nejen měření *Q BCR-ABL1* v uzlových bodech, ale také vývoj kinetiky transkriptu *BCR-ABL1* v čase u jednotlivých pacientů a jeho vliv na jejich další osud. Důvodů, kvůli kterým bodové měření nemusí být optimální, je hned několik. Kritérium optimální časné odpovědi (*Q BCR-ABL1* ≤ 10 %<sup>15</sup> ve 3. měsíci od nasazení TKI) totiž nezohledňuje vstupní hodnotu pacienta, ale pouze míru redukce ze standardizované hodnoty. IS byla skvělou pomůckou pro sjednocení





**Graf 1. Vliv HT na parametry přežití u pacientů, kteří nedosáhnou EMR. Při HT ≤ 76 dnů dosahují pacienti signifikantně lepšího OS (A) a PFS (B). Upraveno dle [41].**

EMR – časná molekulární odpověď (*early molecular response*), HT – poločas snižení (*halving time*), OS – celkové přežití (*overall survival*), PFS – přežití bez progresu (*progression-free survival*)

výsledků, ale nemusí být vhodným řešením pro všechny pacienty. Z klinické praxe také víme, že odběr krve nemusí nastat v přesně definovaných uzlových bodech terapie, ale může se z různých důvodů uskutečnit v rozmezí dokonce několika týdnů.

Analýza vývoje kinetiky molekulární odpovědi přinesla nové pojmy: poločas snižení (*halving time* – HT), vyjadřující ve dnech dobu do snížení hladiny transkriptu na polovinu původní hodnoty, a čas zdvojení (*doubling time* – DT), označující dobu, za kterou dojde k dosažení dvojnásobku původní hodnoty. Matematicky je HT vyjádřen následovně:

$HT = -\ln(2)/k$ , kde hodnota  $k$  vyjadřuje míru poklesu  $Q$  *BCR-ABL1*, tedy:

$k = [\ln(b) - \ln(a)] / d$ , kde  $a$  je vstupní hodnota  $Q$  *BCR-ABL1*,  $b$  je aktuálně měřená hodnota  $Q$  *BCR-ABL1* a  $d$  je počet dní mezi těmito měřeními.

Jako první s konceptem rychlosti časné eliminace transkriptu *BCR-ABL1* pracovali Hanfstein et al. v roce 2014. Z německé studie CML IV, v rámci níž byli pacienti s nově zjištěnou CML v CP léčení čtyřmi režimy založenými na imatinibu, vybrali podskupinu pacientů a porovnávali vstupní hodnoty  $Q$  *BCR-ABL1* s hodnotami po 3 měsících terapie. Jako kontrolní gen byl využit gen

GUS. Medián vstupní hodnoty byl 33 %<sup>15</sup> s výraznou variabilitou hodnot jednotlivých pacientů (0,1–230 %). Pro výpočet individuálního poměru poklesu byly hodnoty *BCR-ABL1* ve 3. měsíci léčby vyděleny vstupními hodnotami. Hladiny transkriptu poklesly v mediánu na 0,04× původní hodnoty, což odpovídá redukci o 1,4-log. Jako nejlepší hranice pro poměr rizik (*hazard ratio* – HR) a OS byla stanovena redukce 0,46-log. Pětileté přežití ve skupině s vyšší mírou redukce bylo 98 % vs. 83 % ve druhé skupině [42]. Použití genu GUS jako kontrolního genu bylo pro autory důležité zejména k přesnějšímu stanovení vstupních hodnot  $Q$  *BCR-ABL1*, protože při použití genů *BCR* či genu *ABL* se předpokládala větší nepřesnost měření. Jak ale později vyšlo najevo, tyto obavy z použití jiných kontrolních genů nebyly naplněny [46].

Jak je uvedeno výše, Branford et al. poté publikovali koncept HT. Ve své práci posuzovali výsledky studie u 528 pacientů s *de novo* diagnostikovanou CML v CP léčených imatinibem, ze kterých 95 nedosáhlo EMR. Při porovnání této skupiny s pacienty s úspěšným dosažením EMR byly popsány signifikantně horší výsledky přežití po 4 letech: OS 87 % vs. 97 %, PFS 86 % vs. 99 %, přežití bez selhání (*failure-free survival* –

FFS) 48 % vs. 85 %. I v této skupině se však vyskytlo 34 pacientů, u kterých byl další vývoj onemocnění příznivý a později dosáhli MMR. Rozhodli se tedy otestovat teorii, že na další průběh onemocnění má u pacientů nedosahujících EMR vliv individuální hodnota HT. Výsledkem porovnávání bylo, že pacienti, u kterých došlo ke snížení hodnoty  $Q$  *BCR-ABL1* na polovinu jejich vstupní hodnoty za 76 dní a méně ( $n = 74/95$ ), měli lepší parametry přežití a vyšší šanci na dosažení MMR než pacienti ( $n = 21/95$ ), u kterých byl HT delší (OS 95 % vs. 58 %, PFS 92 % vs. 63 %, FFS 59 % vs. 6 %, MMR 54 vs. 5 %). Pouze u jednoho pacienta s HT delším než 76 dní nedošlo v průběhu sledování k selhání terapie a pouze jeden dosáhl později MMR. Studie také poukázala na problematiku načasování vyšetření vzorku, které může významně variovat kolem 90 dnů od začátku terapie, a tím také ovlivnit interpretaci výsledků. Použitým kontrolním genem byl gen *BCR* (graf 1) [41].

Huet et al. se kromě ověření dopadu nízkého HT na další osud pacientů zaměřili také na jeho stanovení pomocí 2 různých kontrolních genů *GUS* a *ABL1*. Zjistili, že při použití *GUS* je proti *ABL1* nutné stanovení jiného konverzního faktoru, který je navíc potřeba stanovit vždy nově

**Tab. 3. Podmínky k přerušení léčby TKI. Upraveno dle doporučení ELN 2020 [3].**

Povinné:

- CML v první chronické fázi (pro jiné podmínky není dostatek dat)
- motivovaný pacienta se strukturovanou komunikací
- přístup k vysoce kvalitní qPCR s využitím IS s rychlou dostupností výsledků
- souhlas pacienta s frekventním monitorováním po přerušení léčby: 1× měsíčně po dobu prvních 6 měsíců, každé 2 měsíce po dobu dalšího půl roku a každé 3 měsíce poté

Minimální požadavky:

- terapie v první linii, v druhé pouze pokud důvodem změny TKI byla intolerance
- typický *BCR-ABL1* transkript (e13a2, e14a2)
- terapie TKI delší než 5 let (4 roky při terapii TKI 2. generace)
- délka setrvání v DMR (MR4 nebo lepší) > 2 roky
- bez předchozího selhání léčby

Optimální podmínky:

- terapie TKI delší než 5 let
- délka setrvání v DMR > 3 roky, pokud jde o MR4
- délka setrvání v DMR > 2 roky, pokud jde o MR4.5

DMR – hluboká molekulární odpověď (*deep molecular response*), IS – mezinárodní škála (*International Scale*), qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (*quantitative polymerase chain reaction*), TKI – inhibitor tyrozinové kinázy (*tyrosine kinase inhibitor*)

pro různá období v průběhu léčby. Dále potvrdili, že *GUS* je u pacientů s CML zvýšeně exprimován. Tato zvýšená exprese má potom vliv i na výslednou hodnotu Q *BCR-ABL1*. Autoři zkonstatovali, že použití *GUS* coby kontrolního genu nemá proti *ABL1* vyšší přínos. Studie přinesla další pozorování: vstupní hodnota Q *BCR-ABL1* při použití obou kontrolních genů neměla vliv na prognózu pacientů, ale podobně jako ve výše uvedených pracích byl prokázán vztah dosažení EMR s lepší prognózou. Při měření HT ve vztahu s dosažením MMR po 12 měsících terapie vyšla jako prognosticky významná *cut off* hodnota 19 dnů při použití *ABL1* a 21 dnů při použití *GUS* jako kontrolních genů [46]. Tato hodnota, značně nižší než v předchozích studiích, byla odůvodněna použitím nejen imatinibu, ale i TKI 2. generace, které do té doby v souvislosti s HT studovány nebyly. Kratší HT při použití TKI 2. generace popsali také Iriyama et al. v japonské studii D-First u pacientů léčených dasatinibem v 1. linii. Ve skupině 52 pacientů byl HT kratší než 14 dnů citlivým prediktorem nejen MMR ve 12. měsíci léčby (100 vs. 50 %), ale také dosažení

DMR po 18. měsících (89 vs. 29 %) [43]. Podobný výsledek uvádějí Steegmann et al. v subanalýze studie ENEST1st u pacientů s dalším TKI 2. generace, nilotinibem, v 1. linii. Celkem 72 % pacientů s HT ≤ 13 dnů dosáhlo DMR po 18 měsících léčby.

Protože lze pomocí stanovení HT poměrně spolehlivě určit skupinu pacientů s vysokou šancí na dosažení optimální odpovědi na léčbu, pokusili se Pennisi et al. odpovědět na otázku, zda naopak parametr DT dokáže identifikovat pacienty s rizikem selhání terapie. Sledovali léčebnou odpověď u 305 pacientů léčených imatinibem v 1. linii, kteří v průběhu léčby dosáhli odpovědi MR3 nebo hlubší a u nichž byl následně zaznamenán nárůst hodnoty transkriptu. Tyto pacienty rozdělili do dvou skupin: v první skupině bylo 187 pacientů, kteří navzdory přechodnému nárůstu Q *BCR-ABL1*<sup>IS</sup> udrželi MR3 a pokračovali v další léčbě, zatímco druhá skupina zahrnovala 118 pacientů, kteří po nárůstu hladiny transkriptu postupně ztratili MR3, a tak dospěli k selhání terapie. Analýza potvrdila, že pacienti v první skupině měli signifikantně delší DT než ti, u kterých terapie selhala

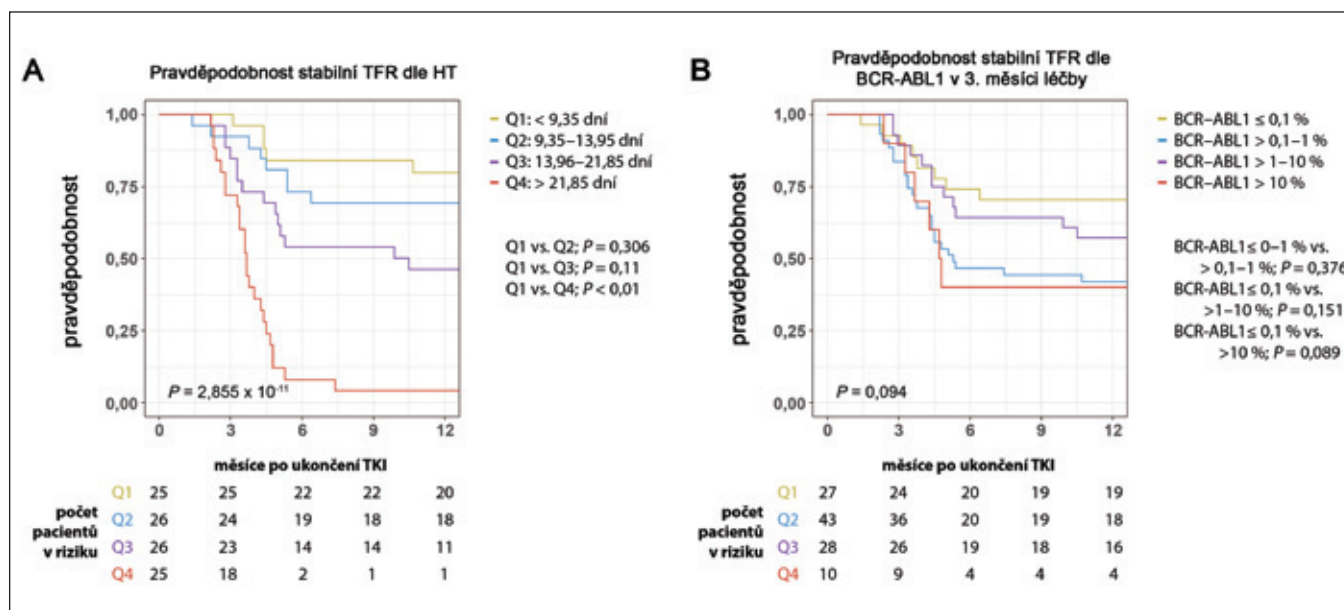
(57,8 vs. 41,45 dnů). Po selhání 1. linie bylo 98 pacientů léčeno TKI 2. generace, z nichž 21 bylo rezistentních i vůči této léčbě. DT pacientů byl při 2. selhání významně kratší než při selhání 1. linie (27,2 vs. 41,45 dnů). Je tedy zřejmé, že DT je nositelem prediktivní hodnoty selhání terapie [44].

Z výše zmíněných poznatků vyplývá, že *halving time* i *doubling time* mají schopnost předpovědět pozdní molekulární odpověď a její další vývoj. Protože je v moderní éře léčby CML novým léčebným cílem u některých pacientů také remise bez léčby TKI, vzniká tak potřeba odpovědět na související otázku: Je možné využít vývoje časné kinetiky poklesu transkriptu *BCR-ABL1* i v rámci predikce dosažení a udržení TFR?

### REMISE BEZ NUTNOSTI LÉČBY A JEJÍ VZTAH K ČASNÉ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚDI

Problematika TFR a její široké *review* byly v českém publikačním prostředí zpracovány v minulém roce [7]. Autoři této práce si tedy dovoluji stručně zrekapitulovat stěžejní fakta a následně se zaměřit na vztah TFR a molekulární odpovědi na léčbu a její kinetiky.

Remise bez léčby je definována jako udržení MMR u pacientů s CML bez medikace TKI. Důvodů pro zavedení TFR jako terapeutického cíle u pacientů s CML je několik: nežádoucí účinky TKI omezující kvalitu života a někdy i život ohrožující, plánování rodičovství, ekonomická zátěž zdravotního systému a v neposlední řadě přání pacientů. Z četných výsledků vysazovacích studií víme, že pokus o TFR je úspěšný globálně v přibližně 50 % případů. Pouze u jedné vysazovací studie bylo dosaženo vyšší úspěšnosti stabilní TFR. Britská studie DESTINY, ve které byla po splnění podmínek pokusu o TFR pacientům nejdříve na rok snížena dávka TKI na polovinu běžné dávky, vykázala úspěšnost kolem 70 % [54]. V absolutní většině případů selhání TFR k tomuto dochází v prvním roce po vysazení TKI. Zdá se, že neúspěšný pokus, tedy ztráta



**Graf 2. Šance k dosažení stabilní TFR vzhledem k HT a EMR. Pacienti v grafu (A) jsou podle HT rozděleni do kvartilů. Šance k dosažení stabilní TFR se zvyšuje při kratším HT. Při porovnání pacientů v jednotlivých kvartilech je šance k stabilní TFR u pacientů v 1. kvartilu signifikantně lepší než u pacientů v 4. kvartilu. V grafu (B) jsou pacienti rozděleni podle hodnoty Q BCR-ABL1 ve 3. měsíci terapie. Žádná skupina pacientů nedosahuje signifikantně lepší šance dosažení stabilní TFR proti ostatním. Upraveno dle [45].**

EMR – časná molekulární odpověď (*early molecular response*), HT – poločas snížení (*halving time*), TFR – remise bez léčby (*treatment free remission*)

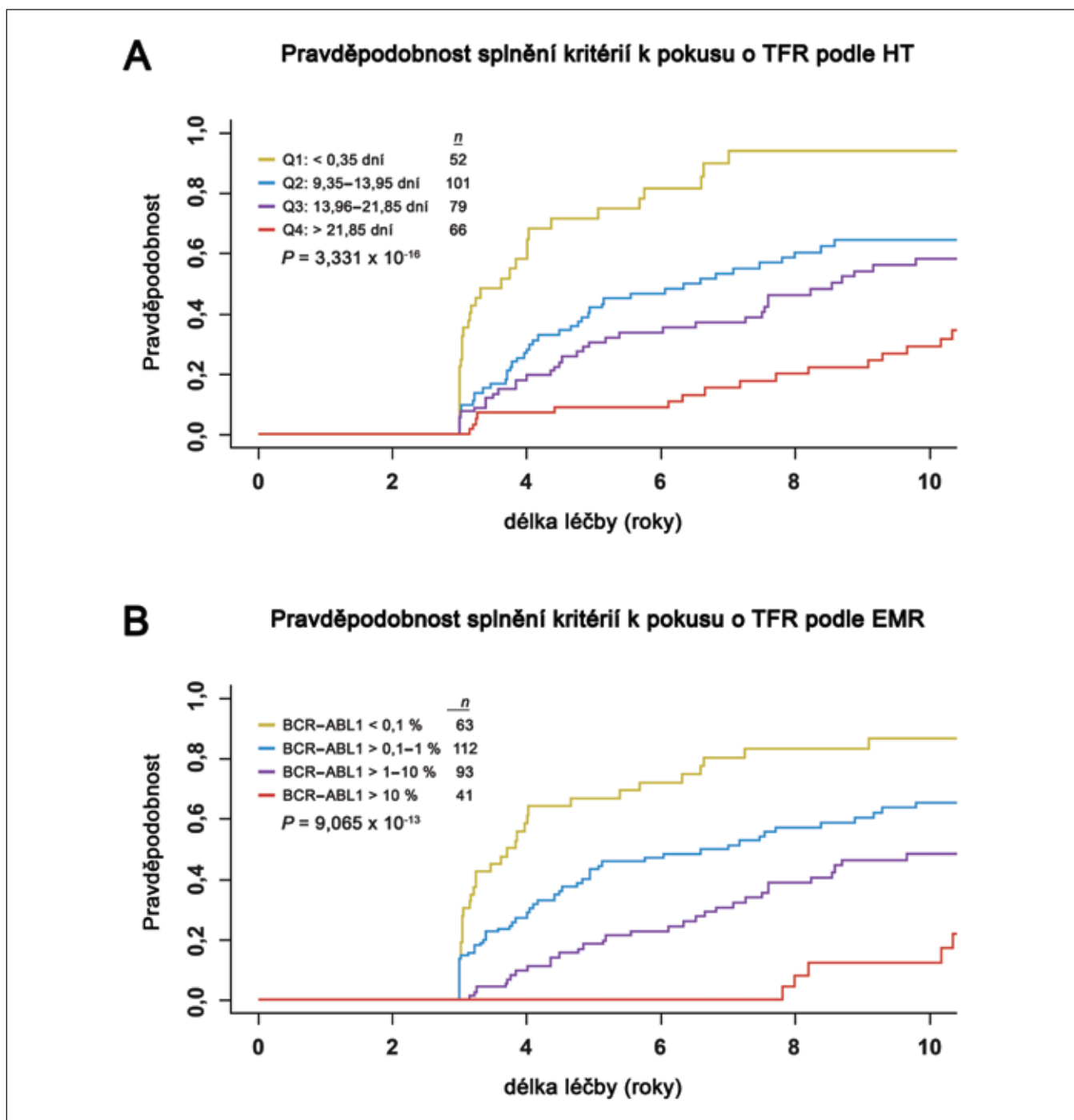
MMR, nevede k většímu riziku pro pacienty a po opětovném nasazení přerušené léčby dochází k obnově léčebné odpovědi. Existují už i zmínky o druhém pokusu o TFR po předchozím selhání. Je však nutno zmínit i fakt, že pokus o TFR je vhodný jen u pacientů naplňujících kritéria k vysazení, kterých je méně než 50 % z celkového počtu vstupně zaléčených pacientů. Tato kritéria navíc zatím nejsou globálně jednotná. Celkový počet pacientů, který dosáhne stabilní a udržitelné TFR, se tak pohybuje kolem 20 %. Jak ale tyto pacienty identifikovat? Z dosud provedených studií vyplývají následující předpoklady pro pokus o TFR: typický typ transkriptu, dosavadní terapie bez výskytu selhání, celková délka terapie TKI, celková délka trvání DMR, předchozí terapie interferonem alfa, počet NK buněk, CD4+ a  $\gamma\delta$ + lymfocytů, motivace pacienta, přístup pečujícího zdravotnického zařízení k pravidelnému a standardizovanému měření. Některé z těchto parametrů se promítají i do aktuálních doporučení panelu expertů The European LeukemiaNet (ELN)

pro vysazování TKI u pacientů s CML (tab. 3) [3].

Při pohledu na souvislost TFR a molekulární odpovědi jsou pro možnost pokusit se o TFR a následně setrvat v dlouhodobé TFR dle ELN důležité tyto 2 parametry: délka terapie TKI minimálně 5 let (4 roky u TKI 2. generace) bez předchozího selhání a DMR v trvání 2 roky a více. Je známo, že TKI vyšších generací navozují v porovnání s imatinibem rychlejší a hlubší molekulární odpověď [55]. Léčba TKI vyšších generací s sebou ale nese i vyšší riziko závažných nežádoucích účinků; zároveň se dosud nepotvrdil vliv na zlepšení OS v porovnání s imatinibem. Proto se imatinib po dlouhá léta udržel po jejich boku jako standard v 1. linii léčby. Je však čas tento trend změnit? Když se na délku a hloubku molekulární odpovědi pohlíží při posuzování vhodnosti k pokusu o TFR, nejsou TKI vyšších generací lepší volbou léčby v 1. linii? Na tyto otázky prozatím odpověď neznáme. Z ELN doporučení však vychází, že pokud není dosaženo dostatečné hloubky odpovědi

na imatinibu, je možné zvážit změnu na jiné TKI, pokud je TFR u daného pacienta žádaným cílem [3].

Pokud se jedná o vztah TFR a časně molekulární odpovědi, ať již v absolutní hodnotě (EMR) či její kinetice (HT), byla v době přípravy tohoto *review* publikována pouze jedna práce zabývající se tímto tématem. Australská pracovní skupina popsala kohortu 115 pacientů, kteří přerušili léčbu TKI se sledováním delším než 12 měsíců. Kritériem pro vysazení byla celková délka TKI terapie alespoň 3 roky a délka trvání MR 4.5 minimálně 2 roky. Z této skupiny bylo 63 (55 %) pacientů po jednom roce ve stabilní TFR. Ve snaze najít spolehlivý prediktor stabilní TFR analyzovali následující proměnné: pohlaví, věk v čase pokusu o TFR, Sokalovo skóre a EUTOS skóre dlouhodobého přežití (EUTOS *long term survival*, ELTS), typ transkriptu, čas do navození MR 4.5, trvání MR 4.5 před pokusem o TFR, celkovou délku terapie TKI, typ TKI před pokusem o TFR, TKI 1. linie, TKI 1. vs. 2. linie, EMR, Q BCR-ABL1 v čase diagnózy a v 3. měsíci léčby, poměr poklesu Q



**Graf 3.** Šance k naplnění kritérií k pokusu o TFR podle HT a EMR. V grafu (A) jsou pacienti rozděleni do kvartilů podle HT. Lze konstatovat, že HT je možno použít jako spolehlivý prediktor splnění podmínek k pokusu o TFR. V grafu (B) jsou pacienti rozděleni dle hladiny transkriptu *BCR-ABL1* dosažené po 3 měsících léčby TKI. Z grafu vyplývá, že dosažení EMR také funguje jako prediktor splnění podmínek k pokusu o TFR. Upraveno dle [45].

EMR – časná molekulární odpověď (*early molecular response*), HT – poločas snížení (*halving time*), TFR – remise bez léčby (*treatment free remission*)

*BCR-ABL1* v době diagnózy a v 3. měsíci, HT v prvních 3 měsících léčby a MMR dosaženou po 12 měsících terapie TKI. Jako jasné prediktory úspěšnosti stabilní TFR byly potvrzeny: HT, typ transkriptu a cel-

ková délka terapie TKI, zatímco dosažení EMR se jako prediktor nepotvrdilo (graf 2). U pacientů se stabilní TFR byl medián HT signifikantně kratší než u pacientů se ztrátou MMR (10,1 vs. 21,7 dní). Na-

opak pacienti s HT kratším než 9,35 dnů měli 80% šanci na dosažení stabilní TFR naproti 4% s HT delším než 21,85 dní. Shanmuganathan et al. ve své analýze dále potvrdili, že HT je nejenom pre-



diktor stabilní TFR, ale i naplnění kritérií k pokusu o vysazení. Pacienti s HT kratším než 9,35 dní splnili kritéria k vysazení v 71 % případů proti 8,9 % případů s počtem delším než 21,85 dní. Zde se potvrdila i prediktivní hodnota poměru poklesu Q *BCR-ABL1* po 3 měsících a EMR. EMR je tedy prediktorem splnění kritérií pro pokus o TFR, ale stabilní TFR predikovat nedokáže (graf 3) [45].

## MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ, VYTVÁŘENÍ PREDIKTIVNÍCH MODELŮ

Po zavedení imatinibu, léku představujícího revoluci v terapii CML, do klinické praxe byla očekávána od jeho účinku vysoká. Pomocí měření zbytkové nemoci, ať už cytogenetickými či molekulárními metodami, bylo možné pozorovat jasný trend poklesu počtu leukemických buněk u většiny pacientů. Po přerušení léčby však došlo poměrně záhy ke ztrátě léčebné odpovědi a obnovení proliferace maligního klonu. Jak je to ale možné? Pokud je leukemická kmenová buňka – prvopočátek a původce onemocnění – nositelem fúzního genu *BCR-ABL1*, jak to, že TKI na ni nepůsobí? Hledání vysvětlení přivedlo vědeckou obec k vytváření matematických modelů odpovědi CML na léčbu TKI.

Jedním z prvních je deterministický *ordinary differential equations* (ODE) model navržený Michor et al. V roce 2005 autoři predikovali matematický model se 4 stupni diferenciací buněk: kmenové buňky, které dávají za vznik progenitorům, z těch vznikají diferencované buňky a ty pak generují terminálně diferencované buňky. Zmíněné vývojové stupně platí jak pro zdravou, tak i leukemickou populaci, u které je fúzní gen *BCR-ABL1* obsažen ve všech stádiích vývoje. Po nasazení imatinibu dochází během léčby k bifázickému poklesu množství leukemických buněk. V 1. fázi, která probíhá od začátku do 3. měsíce terapie, dochází k exponenciálnímu poklesu přibližně o 5 % za den. Ve druhé fázi, tj. mezi 6. a 12. měsícem, je tento pokles pomalejší a představuje asi 0,8 %

za den. Při aplikaci ODE modelu na tato data autoři nabídli vysvětlení, že první pokles odpovídá zvýšenému obratu diferencovaných leukemických buněk, jejichž průměrná doba přežití je 20 dnů. Poté dochází k depleci progenitorů, jejichž průměrné přežití je 125 dnů. Závěrem autoři zkonstatovali nemožnost eradikace nemoci z důvodu rezistence leukemické kmenové buňky vůči imatinibu [19]. Na práci navázali později Tang et al., kteří při využití stejného modelu popsali u pacientů s delším sledováním také 3. fázi poklesu, o které se domnívali, že odráží pokles množství leukemických kmenových buněk [22].

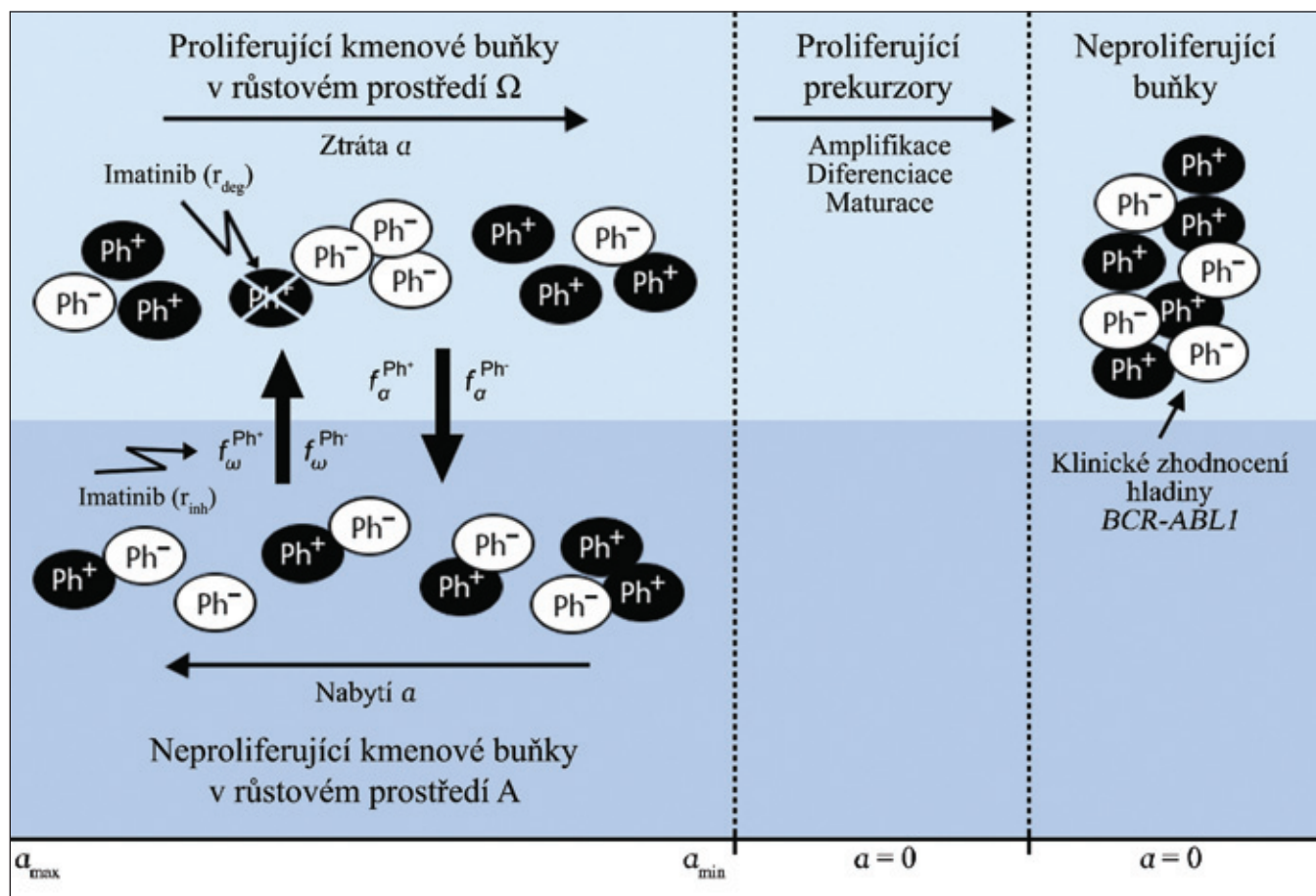
Záhy po publikaci práce s využitím ODE modelu Roeder et al. navrhli možnost použití tzv. *agent-based* (ABM) modelu, který zohledňuje efekt imatinibu na leukemickou kmenovou buňku. Jejich matematický model uvažuje heterogenní populaci hematopoetických kmenových buněk závislých na různých signálech, podnětech a organizaci v rámci mikroprostředí kostní dřene. Imatinib zde působí i na leukemické kmenové buňky, ale pouze na ty, které jsou v aktivním buněčném cyklu. Významná část leukemických buněk je však v klidovém (dormantním) stavu. Tyto nedělící se buňky unikají účinku imatinibu, v době jeho vysazení však mají potenciál se reaktivovat a způsobit relaps onemocnění. Autoři uvažovali také o možnosti použití filgrastimu či cyklické léčby TKI ve snaze o probuzení a následnou eradikaci tohoto dormantního klonu. Připustili možnost eradikace onemocnění za podmínky, že se u pacienta při dlouhodobé terapii nerozvine rezistence (obr. 1) [21].

Dalším typem modelu je stochastický model použitý Lenaerts et al. Výhodou tohoto modelu je dle autorů zachycení stochastické podstaty hematopoézy při menší populaci leukemických buněk. Tvrdí, že fúzní gen *BCR-ABL1* nezvýhodňuje leukemickou kmenovou buňku při proliferaci proti ostatním kmenovým buňkám. Jako cíl léčby tedy nestanovují eradikaci leukemických kmenových buněk, ze kterých nemoc vzniká, ale od-

stranění progenitorových buněk, které jsou zodpovědné za její udržení. Tento model také připouští možnost eradikace nemoci při dostatečně dlouhodobé terapii TKI [18]. Dalšími modely jsou např. *delay differential equation* (DDE), který jako faktor zohledňuje také čas [8], stochastický model, navržený Komarovou a Wodarzem [17], a jiné.

Tyto modely a jejich variace byly použity i ve vztahu k dosažení TFR. Předpokladem úspěšné TFR je totiž buď úplná předchozí eradikace onemocnění, nebo alespoň dostatečná redukce počtu leukemických buněk pod určitou hodnotu. Horn et al. aplikovali už zmíněný ABM model na 69 pacientů léčených imatinibem ve studii IRIS s dostupným 7letým sledováním. Jako validační skupinu použili 31 pacientů ze studie CML IV. Nejprve dospěli k závěru, že není možné předpovědět dlouhodobý výsledek pouze z 1. fáze poklesu Q *BCR-ABL1*, ale je potřeba dostatečného počtu měření také z 2. fáze poklesu, celkově v počtu minimálně 14 měření. Data z měření hladiny transkriptu u skutečných pacientů poté využili na *in silico* interpretaci reziduálního množství leukemických buněk u těchto pacientů. U 14 % pacientů se dle modelu očekává eradikace CML během 15 let, u 31 % během 30 let. U 67 % pacientů při očekávaném věku dožití 80 let pak model počítá s přetrvávající existencí leukemických buněk v průběhu celého života. Autoři studie dále tvrdí, že při znalosti parametrů první a druhé fáze poklesu u konkrétního pacienta může být na základě modelu stanoven čas, po který musí pacient setrvat v MR5, aby mohlo dojít k úspěšnému přerušení léčby bez následného relapsu [15].

Cílem modelování bylo také odpovědět na otázku, zda mají TKI 2. generace větší vliv na redukci počtu leukemických kmenových buněk vzhledem k rychlejšímu a hlubšímu léčebným odpovědím dosaženým v klinických studiích a praxi. Glauche et al. ve své práci a modelování konstatují, že i když je při terapii TKI 2. generace dosaženo signifikantně rychlejší odpovědi v 1. fázi



**Obr. 1. Schéma ABM modelu. Předpokládá se koexistence zdravých ( $Ph^-$ ) a maligních ( $Ph^+$ ) kmenových buněk ve dvou prostředích růstu (A,  $\Omega$ ). Náclinnost buněk k výskytu v prostředí A je dána jejich afinitou ( $a$ ). V prostředí  $\Omega$  dochází k postupné ztrátě  $a$ , v prostředí A naopak k jejímu znovunabytí. Buňky, které ztratily svůj potenciál pobývat k prostředí A (jejich  $a < a_{min}$ ) jsou označeny jako diferencované. Ty vytvářejí klon, který přechodně expanduje (proliferující prekurzory). Tento klon, který existuje po fixně stanovenou dobu bez další expanze, představuje neproliferující prekurzory a terminálně diferencované buňky (neproliferující buňky). Aktivní proliferace kmenových buněk je možná pouze v prostředí  $\Omega$ . Přechod  $Ph^-$  a  $Ph^+$  buněk mezi těmito prostředími je dán charakteristikou  $f_{\omega}^{Ph^-}$ ,  $f_{\omega}^{Ph^+}$ ,  $f_{\sigma}^{Ph^-}$ ,  $f_{\sigma}^{Ph^+}$ . Předpokládá se dvojí specifický efekt imatinibu na  $Ph^+$  buňky: inhibice proliferace  $r_{inh}$  (efekt na  $f_{\omega}^{Ph^+}$ ) a degradace proliferujících kmenových buněk  $r_{deg}$ . Upraveno dle [21].**

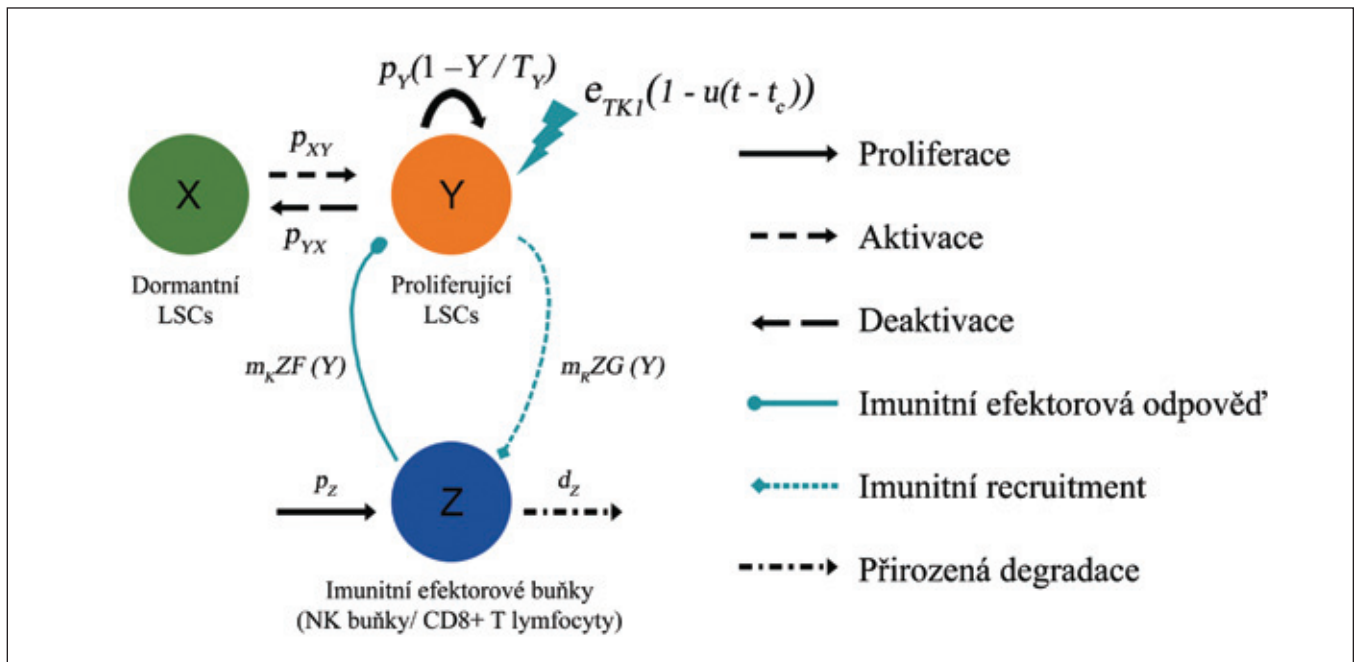
poklesu, je dlouhodobá odpověď, tedy 2. fáze poklesu, téměř totožná v porovnání s odpovědí při léčbě imatinibem. Autoři zdůrazňují interindividuální rozdíly v dynamice onemocnění bez ohledu na použité TKI či časnou odpověď. Uvažují také nad vlivem imunitní odpovědi organismu na přítomnost leukemických buněk, kterou jejich model nebere v potaz [14].

Studie DESTINY, která již byla zmíněna díky výjimečně vysokému procentu dosažení stabilní TFR po předchozí de-eskalaci dávky TKI, rovněž inspirovala k simulačním studiím. S ohledem na jinak malé procento pacientů, které nehledě na výsledek reportovaný ve studii DES-

TINY opravdu dosáhne na stabilní TFR, vyvstává otázka: je možné u ostatních pacientů alespoň snížit dávku, a tak redukovat nežádoucí účinky a zároveň ekonomickou zátěž? Tomuto tématu se v nedávné přehledové práci věnují Žáčková et al. [56]. Fassoni et al. využili simplifikovaného ABM modelu k simulaci snížení dávky TKI o minimálně 50 a více procent na databázi pacientů ze studie IRIS a CML IV. Pro lepší porovnání se studií DESTINY byla vybrána pouze data od pacientů, kteří splňovali kritéria této studie (léčení TKI alespoň po dobu 3 let, z toho alespoň poslední 1 rok v MMR). Dle jejich modelu by snížení dávky na 24,7 % standardní dávky mělo efekti-

vitu 98,4 % v porovnání se standardní dávkou. Model předpokládá, že po snížení dávky může přechodně dojít ke zvýšení Q *BCR-ABL1* v periferní krvi, které ale po krátkém čase opět klesá. Autoři také navrhují schéma postupného snižování dávky, kdy po přesné identifikaci 2. fáze poklesu (cca 18 měsíců od začátku terapie) dojde k redukci na 50 % standardní dávky, a poté následuje observace fáze poklesu při redukci (dalších 18 měsíců) a určení optimální dávky na základě porovnání těchto dvou křivek. Ani u tohoto modelu však není brána v úvahu imunitní odpověď organismu [11].

Vztah imunitního systému a CML simuluje Fassoni et al. v další práci. Využitím



**Obr. 2.** Schéma modelu ODE s imunitní odpovědí. Zobrazeny jsou 3 typy buněk: dormantní (X, zelená) a proliferující (Y, červená, s obratem  $p_Y(1 - Y/T_Y)$  LSC a imunitní efektorové buňky (Z, modrá, generované rychlostí  $p_Z$  a degradující rychlostí  $d_Z$ ). Model předpokládá: (1) Mechanismus aktivace a deaktivace dormantních a proliferujících LSC s rychlostí  $p_{XY}$  a  $p_{YX}$ . (2) Cytotoxický efekt TKI na proliferující LSC s intenzitou  $e_{TKI}$  působící od času  $t = 0$  do ukončení v čase  $t = t_c$ . (3) Imunitní odpověď vůči proliferujícím LSC s intenzitou  $m_{kZF}(Y)$ . (4) Imunitní recruitment při kontaktu imunitních efektorových buněk s leukemickými LSC s intenzitou  $m_{kZG}(Y)$ . Upraveno dle [12].  
 LSC – leukemické kmenové buňky (leukaemic stem cell), TKI – inhibitory tyrosinové kinázy

modelu ODE autoři popisují 2 základní interakce: cílení imunitního systému na buňky CML a stimulaci či inhibici imunitních buněk v přítomnosti nemoci. Výsledkem je 20 submodelů, z nichž 9 splňuje kvalitativní podmínky pro další použití. Společným znakem všech 9 modelů je, že kromě jiných interakcí předpovídají aktivní supresi imunitního systému při vysokém počtu leukemických buněk (obr. 2) [12]. V recentní publikaci stejný kolektiv autorů používá analogický model s využitím dat 21 pacientů po přerušení léčby TKI. Pokud se v modelech jednotlivých pacientů nebrala v úvahu imunitní odpověď, byl u všech pacientů výsledkem simulace relaps onemocnění. To je ale v rozporu s reálným výsledkem u některých pacientů. Na základě této skutečnosti je konstatováno, že k objasnění dalšího vývoje nemoci před a po přerušení TKI je nutný také individuální imunologický komponent nebo jiný tzv. TKI nezávislý protileukemický efekt. Autoři předpokládají existenci tzv. „imunit-

ního okna“ (*immune window*). Ve stadiu, kdy je leukemie nekontrolována, vede nadbytek leukemických buněk k supresi imunitní reakce. Pokud dojde k druhému extrému a počet leukemických buněk klesne pod jistou pacient-specifickou hranici, imunitní systém není stimulován jejich přítomností, a proto stoupá riziko rekurence nemoci. Mezi těmito hodnotami vzniká zmíněné imunitní okno. Protože zmíněný model nedokáže předpovědět efekt vysazení na celkový stav nemoci pouze z údajů měření během standardní léčby TKI, je zde navržena observace vývoje nemoci nejdříve po redukcí dávky. Na základě vývoje po de-eskalaci dávky dokáže model určit pacienty, u kterých je vysoké riziko ztráty léčebné odpovědi po vysazení léčby [16]. Simulace vztahu imunitního systému a CML byla popsána také dalšími autory [9,10,20].

## DISKUZE A ZÁVĚR

V posledních 2 dekádách se možnosti léčby pacientů s CML dramaticky změ-

nily. Po výrazném zlepšení prognózy a celkového přežití se tak pozornost zaměřila na 2 problematické oblasti: identifikaci a management rizikových pacientů v co nejkratším čase a na druhé straně na možnosti dlouhodobého postupu u tzv. „good responders“, tedy pacientů s trvalou optimální léčebnou odpovědí. Ve snaze odlišit tyto dvě skupiny pacientů se dnes již standardně využívají riziková skóre, např. Sokal, Hasford, EUTOS a nově také ELTS, dle doporučení ELN 2020. Nevýhodou využití těchto skórovacích systémů je, že většina z nich byla představena ještě před zavedením TKI pro pacienty léčené hydroxyureou či konvenční chemoterapií (Sokal, Hasford). Nová skóre (EUTOS, ELTS) jsou sice odvozena od výsledků léčby pacientů pomocí TKI, ale vzhledem k tomu, že se jedná o vstupní hodnoty, není zohledněna odpověď pacientů na léčbu. Ta se však jeví být stěžejním prognostickým faktorem, schopným zmírnit či eliminovat vliv případných vysokých hodnot



zmíněných rizikových skóre. V kontextu odpovědi na léčbu získává čím dál větší význam zhodnocení časné odpovědi na léčbu TKI, kdy dosažení hladiny *BCR-ABL1* transkriptů  $\leq 10\%$  po 3 měsících od zahájení terapie přináší benefit v přežití bez události i OS jak pro pacienty léčené imatinibem, tak TKI 2. generace. I ve skupině pacientů, kteří optimální časné odpovědi nedosáhnou, se pořád nacházejí pacienti s dobrou prognózou, které pouze zhodnocením selhání EMR nedokážeme identifikovat. U těchto pacientů lze s výhodou použít měření kinetiky poklesu hladiny transkriptu *BCR-ABL1* v prvních několika měsících od nasazení léčby a stanovení parametru HT. Problémem při stanovení HT v klinické praxi je fakt, že dle doporučení ELN není v čase diagnózy vyžadováno vstupní kvantitativní vyšetření *Q BCR-ABL1* a že vstupní hodnota tak může chybět. Navíc je známo, že vzhledem k velké vstupní náloži je tato hodnota i pro limitace laboratorní metody často velmi nepřesná. Tento fakt lze obejít výpočtem HT až po úvodním poklesu hladiny transkriptu, např. mezi 1. a 3 měsícem.

Kromě možnosti predikovat dosažení optimální léčebné odpovědi se HT ukázal být důležitým i pro predikci úspěšnosti TFR. V poslední době také pozorujeme iniciativu snížení dávky užívaného TKI za účelem snížení nežádoucích účinků a ekonomické zátěže, protože podíl pacientů ve stabilní TFR je malý v porovnání s celkovým počtem pacientů i v porovnání s pacienty s dlouhodobou léčebnou odpovědí. Při dobré toleranci snížené dávky je později možný i pokus o TFR, jak již bylo provedeno ve vysazovací studii DESTINY. Tato studie se vzhledem k výjimečným výsledkům stala inspirací i pro aktuálně probíhající českou celonárodní akademickou studii HALF (registrována na [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), NCT04147533). Pokusu o TFR v této studii předchází snížení na polovinu standardní dávky TKI na dobu 6 měsíců a další redukce v podobě podávání této dávky obden během dalšího půl roku.

Péče o pacienty s CML je v ČR soustředěna do hematologických center. Z toho plyne jasný benefit studie HALF mimo jiné i v rámci sběru solidních dat z kontinuírní péče již před začátkem studie.

CML se pro svojí patogenezi stala také excelentním vzorem pro matematické modelování onkologického onemocnění. Všechny buňky CML jsou standardně nositeli fúzního genu *BCR-ABL1* a nádorová nálož se dá měřit z jednoduchého odběru periferní krve. Tato data jsou navíc pravidelně doplňována během terapie nemocí. Na tomto základě vzniklo množství matematických modelů. Zpočátku se různými koncepty modelovala podstata nemoci, chování leukemických buněk v kostní dřeni a vliv TKI na tyto buňky nebo také možnost jejich totální eradikace. Dnes je pomocí matematických modelů s využitím dat z reálné praxe simulováno snižování dávek TKI, pokusy o TFR a jejich udržitelnost. Vliv imunitního systému a jeho interakce s CML má pravděpodobně zásadní vliv na další vývoj onemocnění, což mnohé modely zohledňují. Obě skutečnosti – jak snaha o matematické modelování v kontextu redukce dávek a TFR, tak téma vlivu imunitního systému na udržitelnost léčebné odpovědi ve fázi redukce dávek TKI i jejich následného vysazování – jsou rovněž součástí ambiciózního plánu studie HALF rozkrýt dosud neobjasněné aspekty optimalizace dlouhodobé léčby pacientů s CML.

## Literatura

- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994–1004.
- Goldberg SL, Savona M, Mauro MJ. Considerations for successful treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(2):98–105.
- Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966–984.
- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the pro-

spective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029–1035.

- Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122(4):515–522.
- Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a pre-specified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(6):747–757.
- Čičáková P, Žáčková D. Vysazování inhibitorů tyrozinkináz u pacientů s chronickou myeloidní leukémií ve studiích a klinické praxi. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2020;26(4):281–293.
- Adimy M, Crauste F. Delay differential equations and autonomous oscillations in hematopoietic stem cell dynamics modeling. *Math Model Nat Phenom*. 2012;7(6):1–22.
- Besse A, Clapp GD, Bernard S, et al. Stability analysis of a model of interaction between the immune system and cancer cells in chronic myelogenous leukemia. *Bull Math Biol*. 2018;80(5):1084–1110.
- Clapp GD, Lepoutre T, El Cheikh R, et al. Implication of the autologous immune system in *BCR-ABL* transcript variations in chronic myelogenous leukemia patients treated with imatinib. *Cancer Res*. 2015;75(19):4053–4062.
- Fassoni AC, Baldow C, Roeder I, Glauche I. Reduced tyrosine kinase inhibitor dose is predicted to be as effective as standard dose in chronic myeloid leukemia: a simulation study based on phase III trial data. *Haematologica*. 2018;103(11):1825–1834.
- Fassoni AC, Roeder I, Glauche I. To cure or not to cure: consequences of immunological interactions in CML treatment. *Bull Math Biol*. 2019;81(7):2345–2395.
- Gottschalk A, Glauche I, Cicconi S, et al. Molecular monitoring during dose reduction predicts recurrence after TKI cessation in CML. *Blood*. 2020;135(10):766–769.
- Glauche I, Kuhn M, Baldow C, et al. Early *BCR-ABL1* reduction is predictive of better event-free survival in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia treated with any tyrosine kinase inhibitor. *Sci Reports*. 2018;16(8):12330.
- Horn M, Glauche I, Muller MC, et al. Model-based decision rules reduce the risk of molecular relapse after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(2):378–384.
- Hähnel T, Baldow C, Guilhot J, et al. Model-based inference and classification of immunologic control mechanisms from TKI cessation and dose reduction in patients with CML. *Cancer Res*. 2020;80(11):2394–2406.
- Komarova NL, Widarz D. Combination therapies against chronic myeloid leukemia: short-term versus long-term strategies. *Cancer Res*. 2009;69(11):4904–4910.



18. Lenaerts T, Pacheco JM, Traulsen A, Dingli D. Tyrosine kinase inhibitor therapy can cure chronic myeloid leukemia without hitting leukemic stem cells. *Haematologica*. 2010;95(6):900–907.
19. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 2005;35(7046):1267–1270.
20. Moore H, Li NK. A mathematical model for chronic myelogenous leukemia (CML) and T cell interaction. *J Theor Biol* 2004;227(4):513–523.
21. Roeder I, Horn M, Glauche I, et al. Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Natur Med*. 2006;12(10):1181–1184.
22. Tang M, Gonen M, Quintas-Cardama A, et al. Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells. *Blood*. 2011;118(6):1622–1631.
23. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, et al. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. *The Leukemia Service. Ann Intern Med*. 1995;122(4):254–261.
24. Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008;112(8):3330–3338.
25. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2006;20(1):29–41.
26. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28–37.
27. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;112(10):2112–2118.
28. Muller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009;23(11):1957–1963.
29. Pagani IS, Dang P, Kommers IO, et al. *BCR-ABL1* genomic DNA PCR response kinetics during first-line imatinib treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018;103(12):2026–2032.
30. Shanmuganathan N, Hughes TP. Molecular monitoring in CML: how deep? How often? How should it influence therapy? *Blood*. 2018;132(20):2125–2133.
31. Breccia M, Molica M, Colafigli G, et al. Early molecular response in chronic myeloid leukemia and halving time: Latest evidences. *Leuk Res*. 2016;48:20–25.
32. Jain P, Kantarjian H, Nazha A, et al. Early responses predict better outcomes in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results with four tyrosine kinase inhibitor modalities. *Blood*. 2013;121(24):4867–4874.
33. Hanfstein B, Muller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*. 2012;26(9):2096–2102.
34. Hughes TP, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib. *Blood*. 2014;123(9):1353–1360.
35. Merx K, Muller MC, Kreil S, et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*. 2002;16(9):1579–1583.
36. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006;107(11):4250–4256.
37. Wang L, Pearson K, Ferguson JE, Clark RE. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. *Br J Hematol* 2003;120(6):990–999.
38. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, et al. Assessment of *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):232–238.
39. Fava C, Rege-ambrin G, Dogliotti I, et al. Early *BCR-ABL1* reduction is predictive of better event-free survival in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia treated with any tyrosine kinase inhibitor. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16:96–100.
40. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, et al. Comparing the prognostic significance of early predictors of survival in chronic myeloid leukemia (CML) treated with imatinib - an analysis of the randomized CML-study IV. *Blood*. 2014;124(21):156.
41. Branford S, Yeung DT, Parker WT, et al. Prognosis for patients with CML and > 10% *BCR-ABL1* after 3 months of imatinib depends on the rate of *BCR-ABL1* decline. *Blood*. 2014;124(4):511–518.
42. Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014;28(10):1988–1992.
43. Iriyama N, Fujisawa S, Yoshida C, et al. Shorter halving time of *BCR-ABL1* transcripts is a novel predictor for achievement of molecular responses in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with dasatinib: Results of the D-first study of Kanto CML study group. *Am J Hematol*. 2015;90(4):282–287.
44. Pennisi MS, Stella S, Vitale SR, et al. *BCR-ABL1* doubling-times and halving-times may predict CML response to tyrosine kinase inhibitors. *Front Oncol*. 2019;9:764. doi: 10.3389/fonc.2019.00764.
45. Shanmuganathan N, Pagani IS, Ross DM, et al. Early *BCR-ABL1* kinetics are predictive of subsequent achievement of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2020;137(9):1196–1207.
46. Huet S, Cony-Makhoul P, Heiblig M, et al. Major molecular response achievement in CML patients can be predicted by *BCR-ABL1/ABL1* or *BCR-ABL1/GUS* Ratio at an earlier time point of follow-up than currently recommended. *PLOS One*. 2014;9(9):106250.
47. Baccarani M, Castegnetti F, Gugliotta G, et al. The proportion of different *BCR-ABL1* transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia* 2019;33(5):1173–1183.
48. Beillard E, Pallisgaard N, van Der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2013;17(12):2474–2486.
49. Zemanová K, Žižková H, Jurček T, et al. Chronická myeloidní leukemie – standardizace molekulárního monitorování hladiny transkriptů *BCR-ABL1* v České republice. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2016;22(1):56–64.
50. Machová Poláková K, Žižková H, Zuna J, et al. Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic PCR: a traffic light stratification model with impact on treatment-free remission. *Leukemia*. 2020;34(8):2113–2124.
51. Cortes J, Talpaz MT, O'Brien S, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3425–3432.
52. Branford S, Rudzki Z, Harper A, et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2003;17(12):2401–2409.
53. Neelakantan P, Gerrad G, Lucas C, et al. Combining *BCR-ABL1* transcript levels at 3 and 6 months in chronic myeloid leukemia: implications for early intervention strategies. *Blood*. 2013;121(14):2739–2742.
54. Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, et al. De-escalation of tyrosine kinase inhibitor therapy before complete treatment discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (DESTITINY): a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6(7):375–383.
55. Cortes JE, Chen C, Davis C, Goldberg SL. Cytogenetic and molecular response with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy in simplicity: an observational study of patients with chronic-phase

chronic myeloid leukemia (CP-CML). Blood. 2019;134(51):2929.

56. Žáčková D, Čičátková P, Kvetková A, et al. Jaké dávky inhibitorů tyrozinkináz jsou v léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukémií optimální? Transfuzie Hematol Dnes. 2021;27(1):28–40.

#### PODÍL AUTORŮ NA RUKOPISU

TH – napsání rukopisu

DŽ, JM – revize a připomínkování rukopisu

#### ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

TH poskytl konzultační služby společnosti Angelini. DŽ poskytla konzultační služby společnosti Angelini, přednášela na edukačním sympoziu společnosti Angelini a satelitním sympoziu společnosti Bristol Myers Squibb a zúčastnila se odborné akce s podporou společnosti Novartis a Bristol Myers Squibb. JM obdržel výzkumné granty od společnosti Novartis, Bristol Myers Squibb a Angelini a přednášel na sympoziích společností Novartis a Bristol Myers Squibb.

Do redakce doručeno dne: 19. 5. 2021.

Přijato po recenzi dne: 1. 6. 2021.

doc. MUDr. Daniela Žáčková, Ph.D.

Interní, hematologická a onkologická  
klinika

LF MU a FN Brno

Jihlavská 20, 625 00 Brno

e-mail: zackova.daniela@fnbrno.cz

## Care Comm s.r.o.

KOMUNIKACE ZDRAVOTNICKÝCH TÉMAT  
JE NAŠE SRDEČNÍ ZÁLEŽITOST



publikační činnost:  
odborné knihy  
a časopisy pro lékaře  
a specialisty



webové portály  
se zdravotnickou  
tematikou



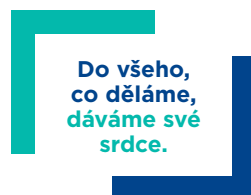
kompletní servis  
při natáčení  
videorozhovorů  
a on-line kongresového  
zpravodajství



originální kongresové  
zpravodajství



pořádání tiskových  
konferencí  
nebo kulatých stolů



Care Comm  
we care...

V případě zájmu se na nás  
neváhejte obrátit:  
[www.carecomm.cz](http://www.carecomm.cz)  
[info@carecomm.cz](mailto:info@carecomm.cz)