

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



PURINOVÉ DERIVÁTY V LÉČBĚ VLASATOBUNĚČNÉ LEUKÉMIE

Bakalářská diplomová práce 2011

Autor: Ivana Švecová

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Hausdorf

Švecová I, 2011: Purinové deriváty v léčbě Vlasatobuněčné leukémie. [Purine analogs in treatment of Hairy cell leukemia. Bc., Thesis, in Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis is about significant role of purine nukleoside analogs in the treatment of indolent lymphoproliferative disorder, named Hairy cell leukemia. Preliminary there is description of this uncommon disease and possibilities of it's detection is included. Studies with two purine analogues deoxycoformycin and 2-chlorodeoxyadenosine and their mechanism of action are mentioned. Then comparisons with older variants of treatment and introducing some novel cytotoxic agents like a therapeutic strategies for patients with relapsed disease are discussed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych na tomto místě poděkovat školiteli MUDr. Pavlovi Hausdorfovi za odborné vedení práce a rodině za trpělivost a toleranci.

Obsah

1. Cíl práce	1
2. Úvod	2
3. Příčiny nemoci.....	2
4. Vlasaté buňky	3
5. Projevy	4
6. Vyšetření k průkazu nemoci.....	4
6.1 Biopsie	5
6.2 TRAP.....	5
6.3 B – ly 7	5
6.4 DBA.44 a L26 (CD20)	6
6.5 Anti – HC2.....	6
6.6 PCR.....	6
7. Kritéria pro hodnocení výsledků léčby	6
8. Starší léčebné metody.....	7
8.1 Splenektomie	7
8.2 Interferon- α (IFN- α)	8
8.3 Androgeny	9
8.4 Glukokortikoidy.....	9
8.5 Leukaferéza	9
8.6 Chemoterapeutika	9
9. Purinové deriváty	9
9.1. 2-chlorodeoxyadenosin.....	10
9.1.1 Příprava 2-CdA	10
9.1.2 Dávkování	11
9.1.3 Mechanismus účinku	12
9.1.4 Rezistence buněk k CdA léčbě	14
9.1.5 Klinické účinky	15
9.1.6 Nejčastější předchozí léčba.....	15
9.1.7 Účinnost CdA proti HCL	15
9.1.8 Krevní obraz po léčbě	17
9.1.9 Nežádoucí účinky.....	19
9.1.10 Sekundární malignita	19
9.2 2'-Deoxycoformycin (DCF).....	20

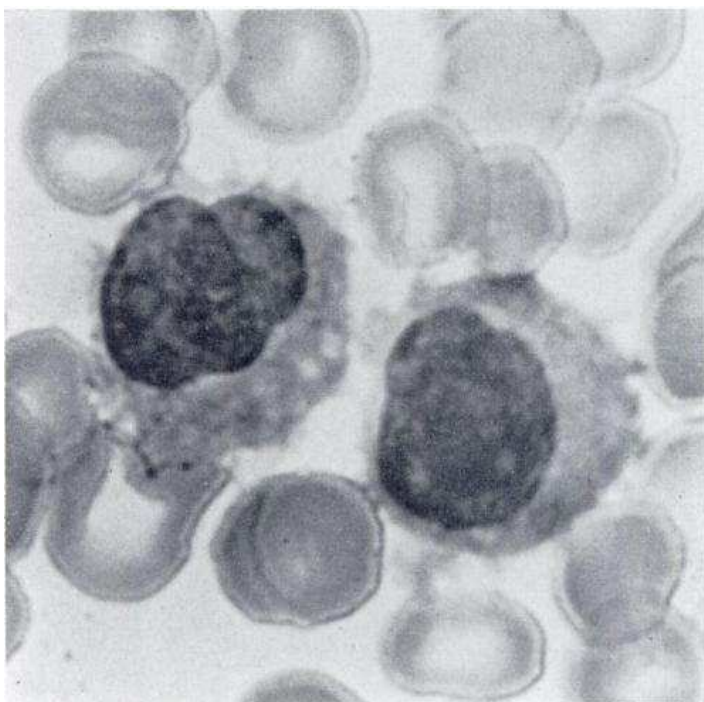
9.2.1 Příprava DCF	20
9.2.2 Klinické testování	21
9.2.3 Mechanismus účinku	22
9.2.4 Křížová rezistence.....	23
9.2.5 Dávkování	23
9.2.6 Účinky proti HCL	24
9.2.7 Nežádoucí účinky.....	25
9.2.8 Krevní obraz.....	26
9.2.9 Kostní dřevň.....	27
9.3 Fludarabin (FA)	28
9.4 Minimální reziduální nemoc po léčbě purinovými deriváty	29
10. Nové léčebné metody	29
10. 1 Rituximab (C2B8)	29
10. 2 BL22	30
10. 3 LMB-2	30
11. Srovnání účinku purinových derivátů s ostatními léčebnými metodami	30
12. Diskuze.....	32
13. Závěr.....	35
14. Seznam použitých zkratk.....	36
15. Literatura	38

1. Cíl práce

Cílem práce je seznámit veřejnost s touto vzácnou lymfoproliferativní chorobou a nastínit možnosti její léčby. Hlavní důraz je kladen na léčbu purinovými deriváty, která je v současné době nejvýznamnější. Součástí práce je podrobné popsání mechanismu na buněčné úrovni a léčebné účinky doložené na konkrétních příkladech z dostupných studií. Snažila jsem se porovnat účinky i starších léčebných činitelů vzhledem k purinovým derivátům. Závěr práce je věnován novinkám a nadějím, které mohou být slibnou alternativou právě purinovým derivátům.

2. Úvod

Vlasatobuněčná leukémie (HCL=hairy cell leukemia) je vzácné maligní onemocnění buněk B linie, zahrnuje asi 2 % všech případů leukémie. V USA ročně onemocní 500 až 600 pacientů za rok (Bouroncle a kol. 1958). Postihuje dospělé osoby, většinou muže, s poměrem k ženám: 3,5-4,5:1 (Bernstein a kol. 1990). Dříve byla nemoc označovaná leukémií z retikulárních buněk nebo také leukemická retikuloendotelióza. Poprvé ji uceleně popsala Bertha Bouronclová v 50. letech minulého století (obrázek 1), avšak první zprávy o



retikuloendotelióze existují již od roku 1923 (Bouroncle a kol. 1958). Významným autorem byl Ewald (1923), který popsal charakteristické znaky hyperplázie v krvetvorných orgánech a v krvi. Název vlasaté buňky pro tuto specifickou leukemii zavedli Schreck a Donelly v roce 1966. Po roce 1970 byl již zaveden název nemoci vlasatobuněčná leukémie. U nás se jí nejvíce zabýval Ladislav Chrobák (Chrobák 1999).

Obr. 1: 2 retikulární buňky zvýrazněné pomocí Wrightova barvení. Zvětšení 2000x (Bouroncle a kol. 1958).

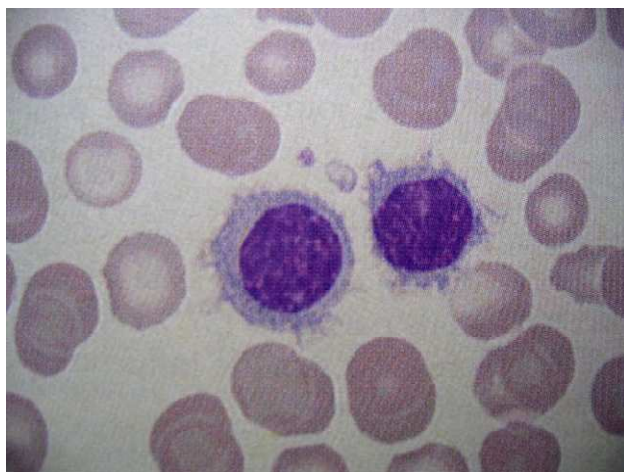
3. Příčiny nemoci

Jednoznačná příčina vzniku HCL není známa. Nebyl potvrzen žádný vztah ke kouření nebo rozpouštědlům tuků (Clavel a kol. 1995). Převládající výskyt nemoci u mužů může poukazovat na pracovní riziko. Na základě analýzy 515 případů bylo doloženo zvýšené riziko při vystavení herbicidům, insekticidům a fungicidům a impregnačním látkám (Hardel a kol. 2002). Nordstom a kol. (1998) potvrzuje, že lidé pracující v zemědělství mají vyšší pravděpodobnost postižení touto chorobou. Jedná se zejména o styk se zemědělskými zvířaty

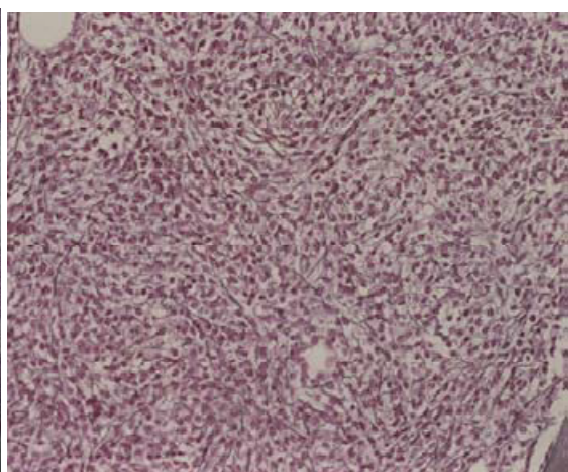
jako jsou koně, dobytek, prasata, drůbež a ovce. Při vyšetřování 226 mužů postižených touto chorobou se ukázalo, že 20,8% z nich jsou farmáři. DNA virus se může přenést díky nedostatečné hygieně při práci se zvířaty (v souvislosti s leukémií hovězího dobytka) nebo po užití pesticidů. Zvláště statisticky významné byly organofosforové insekticidy. Zajímavé bylo zjištění vlivu píce na HCL. Vysvětlením může být napadení píce či kukuřice mykotoxiny, které jsou produkovány vlivem nevhodného skladování (Clavel a kol. 1996). Mluví se také o genetické predispozici pro tuto nemoc. Za posledních 20 let se vyskytlo 15 případů v rámci rodiny. Všichni měli společné znaky, jako jsou HLA- haplotyp A2 a HLA epitopy Bw4 a Bw6 (Gramatovici a kol. 1993).

4. Vlasaté buňky

V periferní krvi jsou malé lymfoidní buňky s oválným jádrem, vyznačují se menším množstvím chromatinu než v normálních lymfocytech, nepravidelným tvarem a absencí granulí. Větší množství bledé cytoplazmy je původcem vláskatých výběžků, vytvořených při roztěru preparátu (obrázek 2). Uvnitř buňky je mnoho mitochondrií a ribozomů. Na povrchu aktinová vlákna tvoří mikrovily a lamely, nejlépe viditelné skenovacím elektronovým mikroskopem. Infiltrát v kostní dřeni je charakteristický buňkami daleko od sebe, malá jádra, nejsou vidět žádné shluky lymfocytů. Dochází ke zmnožení retikulárních vláken, přítomných hlavně ve stromatu krvevorných orgánů. Tomuto nálezu se přezdívá „suchá punkce“. Právě v kostní dřeni se HCL nejlépe diagnostikuje (obrázek 3). Ve slezině se HC ukládají v červené pulpě, bílá obvykle atrofuje (Handin a kol. 2003).



Obr. 2: Dvě HC buňky s charakteristickými výběžky (Raimbough a kol. 2009).



Obr. 3: Retikulární dřeňová fibróza (Raida a kol. 2008).

5. Projevy

Dlouho se nevědělo, z jakých buněk vlasaté buňky pocházejí. Původně byla popsána jako monocyto-lymfocytární kříženec. Později se ale ukázalo, že její původ je v buňkách B linie podle přítomnosti pouze lehkého řetězce povrchového imunoglobulinu a průkazu přestavby genu pro těžký a lehký řetězec Ig (Jansen a kol. 1982). Vzácně může být HCL pozorována u T-buněk (Saxon a kol. 1978) nebo v kombinaci T a B fenotypu (Burns a kol. 1977). HCL může vznikat transformací z jiné B-lymfocytární leukémie, například chronické lymfatické leukémie. Tato skutečnost je umožněna tím, že HCL je odvozena od klonální expanze buněk v pozdějším stádiu vývoje než u jiných leukémií (Foroni a kol. 1987).

Příznaky nemoci jsou charakterizované zvětšenou slezinou (splenomegalie), infiltrací dřeně nádorovým klonem a s tím související cypopenií. Výsledkem jsou anémické stavy (normocytární a normochromní) či krvácení z nedostatku krevních destiček (trombocytopenie). Nicméně asi 10% postižených není nutné léčit, protože jsou asymptomatictí nebo mají jen mírnou splenomegalii, málo cirkulujících HC buněk a více granulocytů (Golomb a kol. 1978). Dokonce byl popsán i případ ženy, která prodělala spontánní vyléčení do 8 let od zjištění nemoci bez jakékoliv léčby (Bouroncle a kol. 1958). Započetí terapie je podmíněno hodnotami krevních destiček pod 100 000/ μ L, hemoglobin < 12 g/dL, absolutní počet granulocytů < 1000, bilirubin v séru < 2,0 mg/dL, kreatinin v séru < 2 mg/dL (Estey a kol. 1992). Splenomegalie je u vyšetření přítomna až u 85% pacientů. Mohou pak následovat další obtíže, jako je infarkt tkáně či ruptura sleziny. Ta je vůbec nejčastější právě u HCL pacientů vzhledem k ostatním hematologickým nádorům. Slezina je tedy nejvíce postiženým orgánem v případě HCL. Nejhojněji se HC buňky ukládají do červené pulpy, vaziva sinusů. HCL také postihuje téměř vždy játra, Kupferovy buňky, často dochází k hepatomegalii. Jaterní testy ale bývají v pořádku. Není postižena funkce, ale dochází k fibróze, podobně jako u kostní dřeně. Lymfatické uzliny nebývají zvětšené, jen asi u 5% nemocných. Také extralymfatické a extramedulární postižení je vzácné, u 8% případů se objevila kožní postižení (Ralda a kol. 2008).

6. Vyšetření k průkazu nemoci

Vlasaté buňky jsou unikátní mezi krevními buňkami tím, že je lze charakterizovat cytoplazmatickým barvením pro tartát rezistentní kyselou fosfatázu (TRAP).

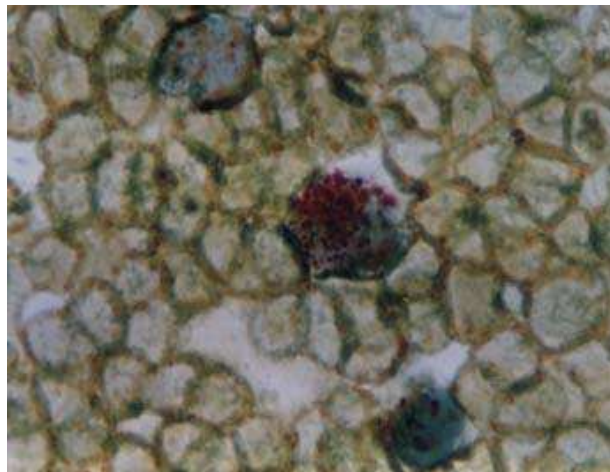
Imunofenotyp nádorových buněk vykazuje B - asociované antigeny (CD19, CD20, CD22, CD79a). Jsou typicky negativní na CD5, CD10 a CD23. Silně exprimují CD11c, α receptor interleukinu 2, povrchový imunoglobulin CD25, FMC7 jako epitop CD20 a antigen CD103. Je těžké najít pro diagnózu HCL specifický marker, protože mnoho těchto antigenů může být přítomno i u jiných nemocí. Avšak silnou specifitu k HC buňkám mají CD25, CD11c a HC-2, které by mohly sloužit k rozeznávání HCL od jiných B – lymfoproliferativních nemocí. Geny pro imunoglobulinový těžký a lehký řetězec jsou přeskupené, variabilní oblasti jsou mutované (IGHVDJ) (Handin a kol. 2003).

6.1 Biopsie

U nemocných je někdy toto důležité vyšetření nemožné provést. Silná fibróza kostní dřeně a cytopenie způsobují „suchou punkci“ a při těchto skutečnostech je velmi pravděpodobné, že se jedná o pacienta s vlasatobuněčnou leukémií. Některé studie jsou neúplné, protože pacienti po léčbě toto vyšetření odmítnou podstoupit, a není tak možné zjistit reziduální buňky.

6.2 TRAP

Prokázání přítomnosti TRAP (tartát rezistentní kyselé fosfatázy) je spolu s morfolo­gickými znaky HCL základní vyšetřovací postup. Vzorek s nátěrem je fixován v aceton-formalínu a



vystaven působení acetát-tartátovému pufru ve 37°C na 120 minut. Poté je vzorek obarven kontrastní látkou hematoxylinem. Inhibicí kyselé fosfatázy je potvrzena absence enzymatické aktivity v granulocytech (Machii a Kitani 1984). Intenzita reakce je u HCL výrazná, k určení diagnózy stačí 2 pozitivní buňky v nátěru (obrázek 4) (Mover a kol. 1972).

Obr. 4: TRAP pozitivita nátěru kostní dřeně (Raida a kol. 2008).

6.3 B – ly 7

Tato monoklonální protilátka je pro HC buňky vysoce specifická, důkazem je 28 pozitivních vzorků, které B – ly 7 dokázala odhalit. Tedy 100% detekce. Buňky jiných, blíže příbuzných B – buněčných chorob, jako jsou prolymfatická leukémie a splenický lymfom s vilózními lymfocyty, označila za negativní. Protilátka by mohla být užitečná k odhalení minimální reziduální nemoci po залечení (Mulligan a kol. 1990).

6.4 DBA.44 a L26 (CD20)

Úspěšnost těchto protilátek je 98,5%, došlo k detekci vlasatých buněk u 206 vzorků od 209 HCL pacientů. DBA.44 je monoklonální protilátka IgM třídy a byla specificky vytvořena pro HCL. Reaguje se subpopulacemi plášťových buněk a monocytárními B buňkami v lymfatických uzlinách, v marginální zóně lymfocytů ve slezině (Hounieu a kol. 1992). Barvení je komplexnější než v případě L26, zahrnuje cytoplazmatickou membránu i granula. Může se stát, že označí HC buňky v negativním vzorku. L26 může nesprávně označit 1 – 10% buněk, DBA.44 až 10 buněk v celé biopsii bez HC. Nesprávně pozitivní buňky jsou transformované lymfocyty, s podobnými morfologickými charakteristikami jako HC, avšak často se vyskytují ve shlucích. Naopak nesprávně negativní výsledky (ve 2 % vzorků) mohou být způsobeny technicky špatně provedeným nátěrem s hustým prostředím, kde se malé lymfocyty špatně detekují (Ellison a kol. 1994).

6.5 Anti – HC2

Reaktivita s HC buňkami byla zjišťována u vzorku ze sleziny. Pozitivně tato protilátka označila 3/5 vzorků HCL pacientů, podobně jako HC1 (2/5) a navíc se rovněž ukázala být pozitivní pro myelomonocytární leukémii (Visser a kol. 1989).

6.6 PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce se používá pro zjištění reziduálních buněk po залечení. Je to metoda vysoce citlivá, dokáže ve vzorku detekovat méně než 5 buněk. Při studiu 7 pacientů, kteří žili v kompletní remisi, se reziduální buňky našly u všech. Při PCR se používá specifická próba odvozená z těžkého Ig řetězce (Ellison a kol. 1994).

7. Kritéria pro hodnocení výsledků léčby

ÚR (=úplná remise): Naprostá absence vlasatých buněk v periferní krvi a kostní dřeni, normalizace krevního obrazu ($Hb \geq 12$ g/dL, bílé krvinky $\geq 3\ 000/\mu\text{L}$, neutrofily $\geq 1\ 500/\mu\text{L}$ a krevní destičky $\geq 100\ 000/\mu\text{L}$), vymizení doprovodných symptomů, adenopatie a hepatosplenomegalie.

ČR (=částečná remise): Redukce více než 50% HC buněk v kostní dřeni, zvýšení o více než 50% buněčnost v periferním krevním obrazu, redukce o více než 50% adenopatie a hepatosplenomegalie (Tallman a kol. 1992).

MR (=minimální remise): Zlepšení hodnot alespoň v jednom krevním elementu nebo více než 50% redukce cirkulujících HC buněk (Kraut a kol. 1986).

Pacienti, kteří nevyhovují ani jednomu z uvedených kritérií, jsou považováni za nereagující („nonresponder“) na danou léčebnou metodu.

MRN (=minimální reziduální nemoc): Absence HCL pomocí morfologie v periferní krvi a kostní dřeni, negativní barvení hematoxylinem a eosinem. Pomocí citlivějších metod je však možné detekovat jednotlivé reziduální HC buňky. Imunohistochemická vyšetření prokazují jejich přítomnost pomocí CD-20 nebo DBA.44 pozitivitu, které rozpoznávají morfologické znaky HC buněk. Jejich počet musí být roven nebo větší než počet CD-45-RO pozitivních buněk. Přítomnost více než 50 % CD20 nebo DBA.44 pozitivních buněk nasvědčuje vývoji MRN, ale jednotná definice je nesnadná, protože chybí standardní kritéria průkazu (Tallman a kol. 1999).

Pokud HCL pacienty ponecháme bez léčby, procento dožití pěti let je v průměru 34,4%; deseti let se dožije jen 29,6%. Pokud dojde ke splenektomii, procento přeživších je o polovinu vyšší. A při léčení například pentostatinem, je úspěšnost po 5 letech 90% (Flinn a kol. 2000).

8. Starší léčebné metody

8.1 Splenektomie

Je to chirurgická metoda pro odstranění sleziny, která byla před nástupem interferonu hlavní léčebnou metodou HCL. Golomb a kol. (1983) provedli splenektomii u 65 pacientů, 27 (41,5 %) mělo úplnou remisi a 38 (58,5 %) částečnou remisi. Ke zlepšení dochází již po 3 – 4 týdnech, 5 leté přežití bylo potvrzeno u 76% ÚR a 62% ČR, celkově 68%. Bylo prokázáno, že velikost sleziny nemá vliv na odpověď či její délku po splenektomii. Vedlejším účinkem je ale omezení produkce bílých krvinek, což je nejspíše důsledek snížení buněčnosti a zvýšení hladiny HC v kostní dřeni. Jako další nepříznivé účinky bylo popsáno krvácení a následná trombóza, či vaskulární onemocnění (Shelley a Buchanan 2009). Hlavním problémem ale zůstává bakteriální infekce, objevující se v každé studii. Reakci pacienta na splenektomii výrazně ovlivňuje stav kostní dřene. Pokud je infiltrace HC difúzní a je omezena hematopoéza, je nutno počítat s nepříznivou prognózou. Proto i po provedení splenektomie může přetrvávat pancytopenie (hlavně granulocytární řada) a je nutné použít jiné léčebné metody. Otázkou je, zda bude splenektomie pro další léčbu přínosná, či ne. Ukázalo se, že pozitivní reakce na léčbu jsou i bez odstranění sleziny (Foon a kol. 1986).

8.2 Interferon- α (IFN- α)

K léčbě HCL byl zaveden roku 1984. Je úspěšný v léčbě chronických lymfoproliferativních nemocí nižšího stupně nebo solidních nádorů. U HCL navodí až 90% odpovědí. Dlouhodobá léčba je ale provázená některými nežádoucími účinky, souhrnně nazvanými interferonový syndrom. Jeho symptomy jsou horečky, bolesti hlavy, svalů, kloubů, únava (Klener 2002). Interferon patří do skupiny glykoproteinů produkovaných živočišnou buňkou jako odpověď na různé podněty. Díky vazbě ke specifickým povrchovým receptorům umožňuje reagovat na maligní nebo virem napadené buňky (Pfeffer a kol. 1998). IFN- α je dostupný v přírodní nebo rekombinované formě. Quesada a kol. (1984) potvrdil terapeutickou účinnost částečně purifikovaného lidského interferonu odvozeného od leukocytů. Následně se výzkum zaměřil na možnost nižších dávek léku ke zmírnění interferonového syndromu, vývojem rekombinantního interferonu (Foon a kol. 1986). Quesada a kol. (1986) uvedli výsledky jeho působení na HCL. Začínali léčbu nejprve s vysokou dávkou 10 – 12 MU/m², kterou postupně kvůli výrazným vedlejším účinkům (viz. interferonový syndrom) snížili na 3 MU a 2 MU (ta se po této studii stala standardní dávkou). Lék byl podáván buď intramuskulárně nebo podkožně injekcí, prvních 4 - 6 měsíců denně, poté 3x týdně do dovršení 1 roku. Z 30 pacientů (7 dříve neléčeno), 9 po léčbě získalo úplnou remisi a 17 parciální remisi. Za 3 – 10 měsíců se u 33% pacientů objevila recidiva nemoci. Všichni pacienti, kteří prošli předešlou léčbou, trpěli vážným průběhem nemoci, s difúzním rozšířením. Všichni dříve neléčení, dosáhli úplné remise. Došlo k výrazné úpravě splenomegalie a krevního obrazu, zlepšila se humorální imunita pacientů. U nesplenektomovaných pacientů ale může přetrvávat trombocytopenie. Remise trvá obvykle do pěti let, pak se opět objeví recidiva. U některých pacientů, dříve neléčených, ale remise trvala i více než 6 let (28% z 55 pacientů) (Rai a kol. 1995).

Na zjištění vhodné dávky IFN se zaměřili Smaley a kol (1991). Porovnávali standardní dávku 2 MU/m² a dávku o desetinou – 0,2 MU/m² u 133 pacientů. Lék byl podáván 28 dní a poté 3 x týdně. 97 pacientů předtím podstoupilo splenektomii, ostatní předtím léčení nebyli. Výsledky v 1. roce zaznamenaly zlepšení hodnoty hemoglobinu, neutrofilů a krevních destiček. Pomocí statistického vyhodnocení se potvrdilo, že standardní dávka má větší účinnost na vylepšení krevního obrazu a dochází rychleji k normalizaci. Na druhou stranu snížená dávka méně často způsobovala tzv. interferonový syndrom. Přesto z této studie vyplývá, že vhodnější alespoň k počáteční léčbě je dávka 0,2 MU/m². Standardní dávka, užívaná v denním intervalu, způsobuje častěji neutropenii, spojenou s bakteriální infekcí

trombocytopenii a myelosupresi. Splenektomie je podle této studie žádoucí a zlepšuje kvalitu odpovědi. Pro trvalou recidivující HCL je doporučena léčba v kombinaci s purinovými deriváty.

8.3 Androgeny

V některých případech byly po splenektomii užity androgeny, kvůli přetrvávající cytopenii. Magie a kol. (1985) podrobili 6 pacientů léčbě androgenových steroidů oxymetholon a fluoxymesteron. Androgeny zlepšují erytropoézu stimulací erythropoetinu, v krevním obraze byly nejviditelnější změny v hemoglobinu (z 7.4 g/dl na 11 g/dl, po 7 týdnech úprava na normu 12g/dl). Také došlo ke zvýšení počtu trombocytů (z 47,000/mm³ na více než 100,000/mm³ za 3 týdny) a došlo i k vylepšení granulopoezy. Úspěšnost léčby byla však jen 50%. Vedlejšími účinky byl vývoj akné a u druhého pacienta žloutenka. Maskulinismus, který je s androgeny často spojován, se u této studie neprojevoval (1 žena).

8.4 Glukokortikoidy

V případě HCL nejsou příliš účinné. Tím, že narušují imunitní systém, zvyšují nebezpečí infekce. Prokázal se jasný vztah mezi kortikoidy a výskytem plísňových i jiných infekcí (Bouza a kol. 1979).

8.5 Leukaferéza

Tato metoda je založená na mimotělním sběru defektních leukocytů. Fay a kol. (1979) uvedli úspěch této léčebné metody u jednoho pacienta HCL, trpícího silnými infekcemi. 90 – 95 % leukemických buněk se podařilo snížit na 40 – 50 % v periferní krvi i kostní dřeni. Došlo ke zmenšení lymfatických uzlin a vymizení kožních nálezů.

8.6 Chemoterapeutika

Při silné infiltraci kostní dřene maligními buňkami bylo vyzkoušeno podání kombinace chemoterapeutik cytosin arabinosid, cyklofosfamid, vinkristin a prednison. Avšak při vážném stavu pacientů nebylo pozorováno zlepšení. Ani 3 pacienti, kteří dostali několik dávek radioaktivního fosforu (³²P), nebyli léčeni s úspěchem (Bouroncle 1979).

9. Purinové deriváty

V roce 1972 objevil Eloise Giblett při genetické analýze u pacientů se SCID dědičnou vadu enzymu ADA. Zjistilo se, že ADA deficiencie ovlivňuje lymfocyty. Hlavní funkcí tohoto enzymu je regulace koncentrace vnitrobuněčného deoxyadenosinu. dATP je toxický

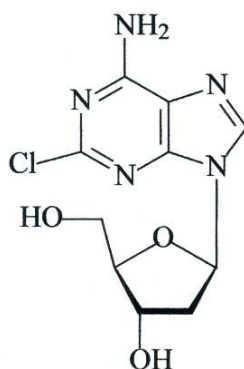
metabolit, jehož akumulace působí na lymfocyty toxicky (Giblett a kol. 1972). Tyto poznatky byly základem pro vývoj látek, které se staly základním kamenem pro léčbu vlasatobuněčné leukémie a jiných lymfoproliferativních chorob.

9.1. 2-chlorodeoxyadenosin

2-CdA (jinak také pod názvy kladribin, Leustatin 2-CdA, Ortho Biotech, Raritan, NJ) byl schválený Správou potravin a léčiv (FDA = Food and Drug Administration) pro léčbu neléčitelných či neúspěšně léčených pacientů HCL. Jeho účinnost proti HCL byla jako první ověřená vědeckou skupinou Piro a kol. v roce 1990. Z dvanácti pacientů se vyskytla v jedenácti případech kompletní remise s minimálními vedlejšími účinky. Tento lék je dále používán k léčbě u chronické lymfatické leukémie (Piro a kol. 1988), u kožních T-buněčných lymfomů mycosis fungoides a Sezary syndrom (Saven a kol. 1992), autoimunitní hemolytické anémie spojené s lymfomem (Carson a kol. 1984). CdA je také úspěšný v léčbě recidivujících pacientů akutní pediatrické myeloidní leukémie (Santana a kol. 1991), či v případech mnohonásobné sklerózy (Beutler a kol. 1996). Kladribin je známý již od 60. let 20. století jako meziprodukt pro syntézu 2-deoxynukleotidů a jeho možné využití pro léčbu leukémie bylo odhaleno v roce 1984 (Tortorella a kol. 2001).

9.1.1 Příprava 2-CdA

2-chlorodeoxyadenosin vzniká substitucí atomu chloru za vodíkový atom v poloze 2 na řetězci molekuly. Halogenová substituce poskytuje molekule rezistenci k deaminaci enzymem adenosin deaminázou (Carson a kol. 1984). Sloučenina (obrázek 5) se může připravovat pomocí glykosylace sodné soli (Kazimierczuk a kol. 1984) nebo enzymaticky výměnou deoxyribózy a ribózy mezi nukleosidy, pomocí katalýzy částečně purifikované transdeoxyribosylázy z bakterie *Lactobacillus helveticus*. Tento enzym katalyzuje přenos deoxyribosylové skupiny mezi deoxyribonukleotidem a bází v rovnovážné reakci: 2-chloroadenin + thymidin \rightleftharpoons CdA + thymin (Carson a kol. 1983). Či pomocí buněk thymin vyžadující bakterie *E. coli*, díky níž se katalyzuje přenos cukerných zbytků z rozmanitých deoxyribonukleotidů, čímž se stane výroba CdA více efektivní (Blank a kol. 1992). Produkty jsou následně izolovány pomocí metody iontová chromatografie. K dosažení čistoty látky se používá účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Dále je látka sterilizována ultrafiltrací a uchována při hodnotě -20°C . (Carson a kol. 1983).



Obr. 5: Kladribin (2-chloro-2-deoxyadenosin)
(Blank a kol. 1992).

9.1.2 Dávkování

Intravenózní:

Kladribin je u lymfoidních nádorů obvykle pacientovi podáván prostřednictvím kontinuální či občasné intravenózní infúze. Nově byl kladribin vyvinut pro orální užití nebo je vpraven podkožní injekcí.

Kontinuální infuze je prováděna průměrně po dobu 5 - 14 dní v dávce 0,12 – 0,14 mg/kg/den. Způsobuje buněčnou smrt rakovinných buněk ve velkém měřítku, s celkovou odpovědí na léčbu téměř 100%. Např. Dearden a kol. (1999) uvedli ve své studii 45 pacientů s HCL poměr 85% ÚR a 16% ČR, recidiva u 29% z nich se objevila v průměru za 45 měsíců. Goodman a kol. (2003) uvedli ve svém rozsáhlém pozorování 207 pacientů podobné výsledky: 95% ÚR, 5% ČR, recidiva u 37% pacientů za 42 měsíců. Bylo však zjištěno, že redukce podávání léku na jedenkrát týdně 0,15 mg/kg po dobu šesti týdnů nemusí mít neblahé důsledky na výsledek léčby. Ukázalo se, že poměry 73% ÚR a 27% ČR s trváním v průměru 35 měsíců jsou sice vzhledem k ÚR nižší než u podávání denního, ale počet pacientů s návratem nemoci je také nižší: jen 17%. Navíc zpožděné intervaly mezi jednotlivými infuzemi by mohly mít příznivý vliv na silnou myelotoxicitu a infekční stavy, které kladribin vyvolává (viz. Nežádoucí účinky). Tato administrace léku by mohla být upřednostněna u pacientů se silnou cytopenií (Lauria a kol. 1999). Ve studii, která srovnávala týdenní a denní dávky 2-CdA výsledky ukázaly, že poměry v ÚR a celkové odpovědi byly podobné u obou skupin, nicméně potvrdily, že denní podávání léku způsobovalo častěji neutropenii a také častěji vedlo k infekcím (konkrétní výsledky viz. Účinnost kladribinu proti HCL) (Robak a kol. 2004).

Orální:

Dávka 0,28 ml/kg/den se rozpustí ve fosforečnanovém roztoku. Takto připravený lék má biologickou aktivitu 55%, zbytek se bez užitku vyloučí močí (Liliemark a kol. 1992). Výsledek je podobný, jestliže se lék zapije společně s jídlem: 42% s jídlem a 46% bez jídla. Protože 2-CdA v podobě roztoku způsobuje degradaci 2-chloroadeninů, je potřeba ho užívat ve dvojnásobných dávkách. V žaludku dochází k jeho degradaci hydrolýzou kyselin a enzymatickou hydrolýzou střevními bakteriemi. Proto dochází ke slabšímu účinku v játrech (Albertioni a kol. 1993). Kladribin, v podobě tablet s krátkodobým užíváním, se užívá v recidivujících případech roztroušené sklerózy (Costello a Sipe 2008).

Podkožní injekce:

Lék je dostupný v ampulkách s 10 mg CdA ve směsi s 0,9% roztokem NaCl v koncentraci 0,2 mg/l. Výsledná látka je poté vstříkována v dávkách 0,14 mg/kg/den 5 po sobě jdoucích dní. Úspěšnost léčby se ukázala být srovnatelná s intravenózním podáním léku. Z 62 pacientů HCL byly výsledné poměry 76% ÚR a 21% ČR, s celkovou účinností 97%. Pouze dva pacienti museli být přeléčeni. Léčba tímto způsobem se hodí pro všechny pacienty HCL i jiná lymfoproliferativní onemocnění, dokonce dovoluje pacientům podávat si lék sami, bez potřeby navštěvovat nemocniční zařízení (Rohr a kol. 2002).

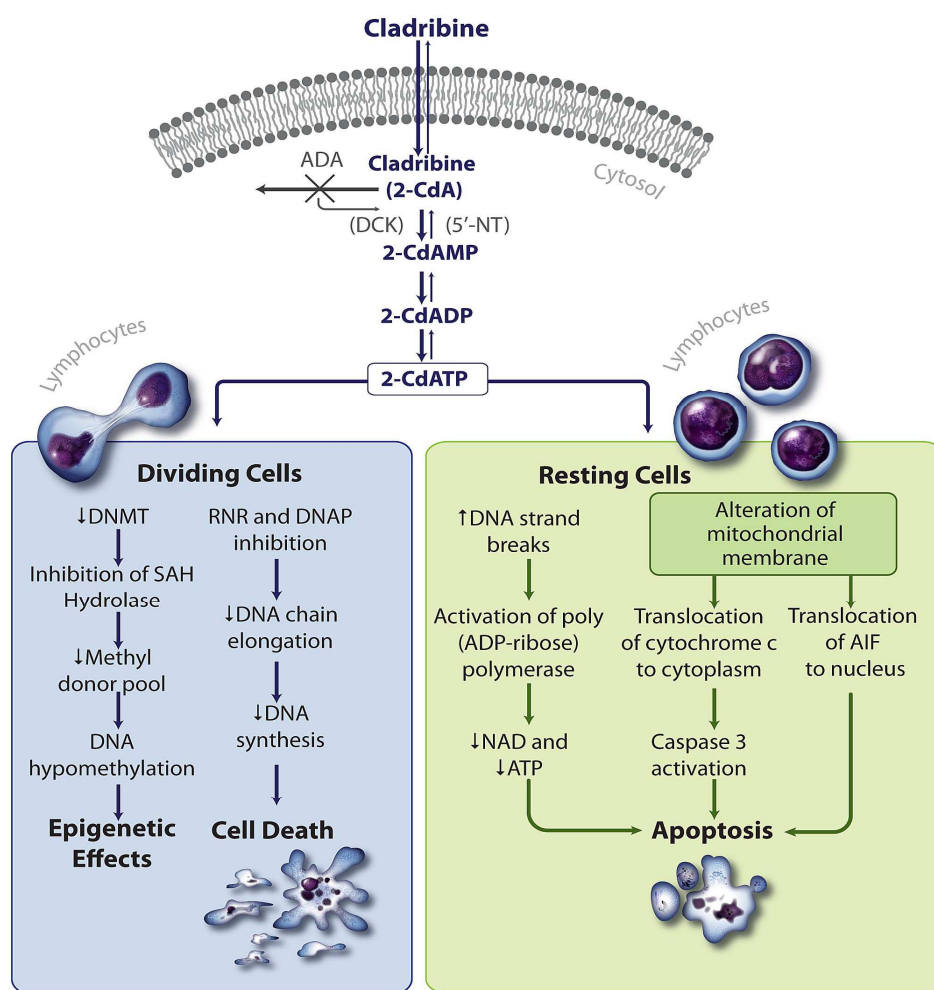
9.1.3 Mechanismus účinku

Kladribin je významný ve srovnání s ostatními deriváty purinů zvláště tím, že se prokázala jeho účinnost nejen proti proliferujícím buňkám, ale také proti buňkám v klidovém stavu. Není však ještě detailně zjištěn přesný mechanismus jeho účinku. Původně se nepředpokládalo, že by purinové deriváty byly klinicky užitečné proti nádorovým buňkám. Převládalo přesvědčení, že by mohly poškozovat zároveň buňky zdravé tkáně. Nespecifická toxicita se však při užití CdA neprokázala (Huang a kol. 1981). Zjistilo se, že CdA je selektivně toxický, to znamená, že se cíleně zaměřuje na buňky s vysokými hladinami dCK a naopak s nízkou aktivitou deoxynukleotidáz. K účinku CdA je nezbytná jeho fosforylace prostřednictvím dCK uvnitř buňky. Postupně tak dochází k intracelulární akumulaci 2-chlorodeoxyadenosin trifosfátů (2-CdA-TP). Dochází k poškození buněčného metabolismu a včlenění 2-CdA-TP do DNA buňky, což má u dělících se buněk za následek ustrnutí v S fázi buněčného cyklu (Carson a kol. 1983). U dělících se buněk je toxicita vyvolaná inhibicí DNA polymerázy nebo inkorporací do DNA (Parker a kol. 1988). Další možností může být znemožnění oprav DNA řetězce a následná akumulace DNA zlomů (Plunkett a kol. 1993). Ke zlomům řetězce DNA po vlivu CdA dochází také díky tomu, že látka silně omezuje činnost ribonukleotid reduktázy (RR), která je zodpovědná za konverzi ribonukleotidů na odpovídající

deoxyribonukletidy. Navíc podporuje činnost endonukleáz k degradaci DNA řetězce (Seto a kol. 1985). Cytotoxický účinek CdA může také pocházet z následné inaktivace 5-adenosylhomocystein hydrolázy (SAHM) jako přirozený důsledek hromadění adenosinů po deoxyadenosinové deaminaci a fosforylaci (Robertson a kol. 1993). Inhibice RR a DNA řetězce je však možná pouze u dělících se buněk. U buněk dormantních je třeba najít jiný systém zodpovědný za cytotoxicitu. Nedělící se lymfocyty podstupují opravu DNA řetězců spojenou částečně s modifikací jaderných proteinů polyADP-ribosylací. Tento jev je spojen se spotřebou buněčné NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) a ATP (Johnstone a kol. 1982). Právě působením CdA a ostatních purinových derivátů na opravu DNA zlomů dochází ke zrychlení tvorby polymerázy polyADP-ribózy (PARP), která způsobuje vyčerpání NAD a ATP, což je pro buňku letální. Podle studie Seta a kol. (1984), již 4 hodiny po působení deoxynukleosidů v buňce dochází k akumulaci DNA zlomů v lymfocytu a ke snížení syntézy RNA. Tyto změny jsou následovány poklesem vnitrobuněčné hladiny NAD do 8 hodin, za 24 hodin poklesne hladina ATP a do 48 hodin nastane buněčná smrt. Pokud ale lymfocyty inkubujeme s 5mM nikotinamidem, NAD prekurzorem a inhibitorem poly (ADP-ribosa) syntetázy, dochází k významnému zabránění vyčerpání NAD. Nikotinamid může tak buňce poskytnou rezistenci vůči deoxyadenosinu a CdA toxicitě, aniž by docházelo ke změnám tvorby dATP či k akumulaci DNA zlomů.

Poškození DNA je spojeno s expresí proteinu P53, který vyvolává programovanou buněčnou smrt, která je hlavním účelem CdA cytotoxicity (Tallman a kol. 1992). Přišlo se na to, že u dělících se buněk může P53 přispívat k cytotoxicitě vazbou na DNA, ve které je inkorporován CdA jako P53/DNA-PK komplex (Kawasaki a kol. 1993). U klidových buněk 2-CdA-TP zasahuje do opravy DNA a vede prostřednictvím zlomů k poruše buněčného metabolismu, což opět vede k expresi P53 a vyvolání apoptózy (Pastor-Anglada a kol. 2004).

Indukce apoptózy vlivem CdA může nastat buď cestou již zmíněného poškození DNA řetězce a expresí P53, nebo přechodem přes permeabilní póry mitochondrií (mtPTP= mitochondrial permeability transition pores). P53 ovlivňuje expresi proteinu BAX s proapoptickým účinkem. Protein BAX vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrie do cytosolu a navázání k apoptotickému proteázovému aktivačnímu faktoru (APAF-1) a prokaspázy 2. Tito tři činitelé spolu dohromady vytvoří komplex. K apoptóze dojde po navázání 2-CdATP v důsledku spuštění kaskády kaspázy 9 (Liu a kol. 1996). Finální část lymfotoxicity je zaměřena na vyvolání fragmentace DNA, která je charakteristickým znakem apoptózy (Robertson a kol. 1993).



Obr. 6: Shrnutí mechanismu účinku kladribinu u dělících i nedělících se buněk. (Sigal a kol. 2010)

9.1.4 Rezistence buněk k CdA léčbě

Podle studie Chandry a kol. (2002) je rezistence CdA zřejmě vyvolaná změnami v metabolické aktivitě, konkrétně enzymu kaspázy-3 cytochromem c. následnými experimenty bylo dokázáno, že rezistentní buňky mají zvýšenou hladinu vázaného Ca^{2+} a také různé hladiny dCK, dGK a 5' nukleotidázy. Ve srovnání se senzitivními buňkami jsou tyto jevy v nesouladu, nedochází k dostatečné fosforylaci CdA na CdATP a fragmentaci DNA. Základem změn v rezistentních buňkách je nedostatek či absence uvolňovaného cytochromu c z mitochondrie do cytosolu, způsobeného nízkým mitochondriálním transmembránovým potenciálem a změnou propustnosti. Na této změně permeability se významně podílí vápník, který chrání buňku před degradací. Aby mohl kladribin vyvolat u buňky apoptózu, je nutné zvýšení hladiny vnitrobuněčného Ca^{2+} . Dokladem toho, že právě vápník je zodpovědný za apoptózu, je pokus s chelátorem vápníku BAPTA-AM (50 mM). Po jeho působení dochází

k blokaci kaspázy a nedojde k fragmentaci DNA. U rezistentních buněk je vápník v cytosolu ve vázané formě, tudíž nemůže dojít ke všem jeho spráženým reakcím.

9.1.5 Klinické účinky

Kladribin účinkuje ve dvou fázích: rychlá počáteční fáze s poločasem účinku půl hodiny, následovaná druhou fází s nástupem účinku po sedmi hodinách. Pro první fázi se nejčastěji používá podávání CdA kontinuální intravenózní infuzí po dobu 7 dní (Juliusson a Liliemark 1999). V preklinických datech se totiž ukázalo, že k dosažení usmrcení maximálního počtu buněk je potřeba prodloužená inkubace CdA s lymfocyty. Antileukemické a imunosupresivní účinky byly ověřeny u skupiny devíti pacientů s hematologickými zhoubnými nádory, již dříve neúspěšně léčenými. Kladribin dostávali v dávce 0,1 - 1 mg/kg denně intravenózní infuzí po dobu 4 - 14 dní. CdA dokázal snížit počet blastů o polovinu, dokonce u jednoho pacienta s T-buněčným lymfomem a dalšího s chronickou myeloidní leukémií, CdA eliminoval všechny blasty z krve a kostní dřeně (Carson a kol. 1984).

9.1.6 Nejčastější předchozí léčba

Jak je ukázáno v tabulce 1, nejčastěji byli pacienti dříve neúspěšně léčeni interferonem- α , splenektomií a méně často pomocí účinného deoxycoformycinu. Kladribin se opakovaně používá málo, protože obvykle vyvolává dlouhotrvající celkovou odpověď a počet recidivujících pacientů je nízký (Saven a kol. 1998).

9.1.7 Účinnost CdA proti HCL

Největší studii pacientů léčených pomocí CdA proti vlasatým buňkám, provedla skupina Saven a kol. 1998. 358 pacientů bez předchozí terapie, léčených intravenózní infuzí 7 dní v dávkách 0,087 nebo 0,1 mg/kg váhy těla (lék od rozdílných dodavatelů). Celkově na léčbu pozitivně reagovalo 98% (341) pacientů, 90 osob dostalo recidivu. 53 recidivujících pacientů bylo opět přeléčeno kladribinem, z toho 6 pacientů neúspěšně, s nutností podstoupit léčbu potřetí. Přesto je počet pacientů, kteří potřebují vícenásobné přeléčení, nízký. Pacienti, kteří recidivují, mohou být opět úspěšně léčeni kladribinem. 21 pacientů zemřelo v mediánu 39 měsíců. Nejvíce případů bylo spojeno se sekundárním nádorovým bujením (7), kardiovaskulární choroby, mozková příhoda (7), infekční komplikace (3) a ve spojitosti přímo s HCL zemřeli tři pacienti. Z nádorových onemocnění je čtenější solidní nádor než nádory týkající se krvetvorby. (Saven a kol. 1998). Za první rozsáhlejší studii kladribinem léčených pacientů s HCL, která využívá nekonvenční podávání léku 2 hodinovou infuzí po dobu 5 dnů

v denní dávce 0,12 mg/kg, je považováno sedmileté pozorování 103 pacientů v letech 1991-1997. 6 pacientů mělo HCL variantní (HCL-V). 41 pacientů prodělalo předchozí léčbu. Celková citlivost na léčbu činila 96%. 20 pacientů po léčbě dostalo recidivu (9/41 u dříve neléčených, 11/34 u dříve léčených). Z deseti přeléčených osob, všichni odpovídali na léčbu. Vícenásobné přeléčení bylo nutné pouze u 3 osob. Čísla potvrzují, že předchozí léčba neovlivňuje úspěšnost léčby kladribinem. V kontrastu klasické HCL, výsledky variantní HCL nebyly příliš příznivé. Z šesti pacientů pouze dva částečně odpovídali na léčbu, zbylí čtyři na léčbu nereagovali. 7 pacientů zemřelo (z toho dva HCL-V), většinou na sekundární malignitu (Robak a kol. 1999). Výsledky oproti tradiční 7 denní kontinuální infuzi jsou podobné, jak se ukazuje při srovnání se studií od Estey a kol. 1992, kde bylo použito podávání léku kontinuálně po dobu 24 hodin. Bylo zde sledováno 46 pacientů HCL, 42 z nich (91%) reagovalo na léčbu. Protože byli pacienti po léčbě dále sledováni jen v průměru 36 měsíců, nebyla u nich detekovaná remise. Pouze u jednoho pacienta, který byl sledován nejdéle (72 měsíců) byla detekována remise vlasatých buněk v kostní dřeni. Zkrácení doby podání z 24 hodin na dvě hodiny tedy nemusí být na závalu, naopak umožňuje pacientovi potřebnou regeneraci a není nutná týdenní hospitalizace v nemocnici. Administrace léku jednou týdně v dávce 0,1 mg/kg denně se ukazuje být také účinná. To potvrdila studie od Lauria a kol. (1999), která dlouhodobě sledovala reakci u 30 pacientů HCL, z nichž 13 prodělalo předchozí léčbu. Všichni pacienti byli v léčbě úspěšní, u 2 pacientů byla dokonce úplná odpověď identifikovaná až po 6 měsících. Tento případ dokládá, že by zhodnocení výsledků léčby nemělo proběhnout příliš brzy, protože v některých případech se neúplná remise může po čase projevit jako úplná. Nemoc postupovala u pěti (17%) pacientů, tři z nich bylo nutné přeléčit. Remise při tomto způsobu dávkování se tedy jeví jako trvalá, podobně jako u intravenózní infuze. Výhoda této léčby spočívá ve snížení infekčních komplikací (pouze 2 pacienti). Mohla by být proto preferována u pacientů trpících neutropenií (viz. Nežádoucí účinky léčby). Zajímavé jsou také výsledky ze studie podání kladribinu podkožní injekcí. 62 pacientů bylo léčeno dávkou CdA 0.14 mg/kg/den po dobu pěti po sobě jdoucích dnů. Celková odpověď na léčbu byla 97%, tedy naprosto srovnatelná s jinými způsoby léčby. Výsledky léčby byly často patrné již brzy (do 10 týdnů), ale u některých pacientů se po několika dalších týdnech až měsících částečná odpověď překlopila na kompletní. Na základě statistických metod bylo zjištěno, že pacienti s normální hladinou hemoglobinu mají větší šanci dostat ÚR, naopak ženy mají v průměru nižší pravděpodobnost, že dosáhnou ÚR (Rohr a kol. 2002).

Tab. 1: Přehled vybraných studií s různou administrací léku.

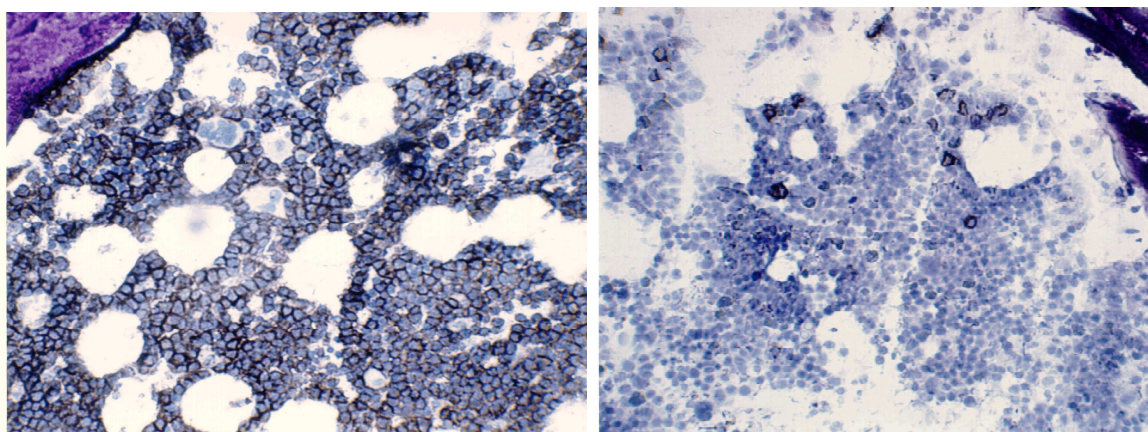
Autor	Dávkování	Počet osob	Odpověď	Recidiva	Předch. léčba
Saven a kol. 1998	7 denní kontinuální intravenozní infuze	358	ÚR=319 (91%) ČR=22 (7%)	90 (26%) za 29 měs.	splk.=95 IFN- α =132 DCF=8
Robak a kol. 1999	5 denní 2 hod. infuze	103	ÚR=75 (77%) ČR=18 (19%)	20 (22%) za 37 měs.	splk.=23 prednison, chlorambucil nebo IFN- α =18
Estey a kol. 1992	7 denní kontinuální intravenozní infuze	46	ÚR=36 (78%) ČR=5 (11%) MR=1 (2%)	1 (2%)	splk.=11 IFN- α =7 IFN+DCF=3 IFN- α +splk.=8
Lauria a kol. 1999	1x týdně po dobu 6 týdnů	30	ÚR=22 (73%) ČR=8 (27%)	5 (17%) za 35 měs	IFN- α =7 CdA=4 DCF=2
Rohr a kol. 2002	5 denní podkožní injekce	62	ÚR=47 (76%) ČR=13 (21%)	15 (25%) za 38 měs.	splk.=10 samotná chemoterapie=3 IFN- α =24

Vysvětlivky: ÚR=úplná remise, ČR=částečná remise, MR=minimální remise, splk.=splenektomie, INF α =interferon α , DCF=deoxycoformycin.

9.1.8 Krevní obraz po léčbě

K určení variability fenotypu vlasatých buněk před a po léčbě kladribinem se užívá analýza průtoková cytometrie a fluorescenční barvení. Zjistí se trvání účinku CdA na imunitní buňky v krvi a kostní dřeni pomocí velké škály markerů (obrázek 7). Ve studii, kterou provedli Juliusson a Lenkei v roce 1994, mělo před léčbou 68 pacientů v krvi a kostní dřeni v průměru 90% vlasatých buněk, diagnostikovaných pomocí pozitivitu CD20. Počet monocytů nepřesáhl 5% z celkového množství buněk. Změny po léčbě byly u všech pacientů podobné. CD20+, CD8+ a NK buňky byly nalezeny v menším množství než před léčbou, zatímco procenta CD4+ byly vyšší. To naznačuje pomalejší pokles CD4+ buněk po CdA léčbě než u ostatních

buněk. V době nejnižšího počtu lymfocytů je poměr CD4/CD8 významně vyšší než před léčbou. Normalizace CD8+, NK buněk a buněk a T buněčným receptorem po léčbě proběhne do 3 měsíců, zatímco normalizace počtu CD4+ buněk v průměru trvá 1 rok, provázená pomalým snižováním poměru CD4/CD8. CD10+ buňky, přítomné v kostní dřeni u akutní lymfoblastické leukémie, měly před léčbou hodnotu $1,30\% \pm 5,92\%$, 3 měsíce po léčbě $3,53\% \pm 8,018$ a po dvou letech od léčby $1,33\% \pm 1,590\%$. K normalizaci do tří měsíců také dochází u aktivované HLA-DR⁺ podjednotky CD4+. Úplný počet HLA DR⁺ podjednotky CD8+ se nejprve snižuje, ale často dochází při obnově ke zvýšené aktivitě a přesáhnutí počtu. K podobnému stavu dochází také v případě monocytů a eosinofilů (Juliusson a Liliemark 1992). Během léčby a krátce po léčbě dochází u pacientů trpících infekcí ke zhoršení cytopenie, provázené snížením hladiny hemoglobinu a krevních destiček a ostatních dále zmíněných buněčných řad. Monocyty se během CdA infuze vytratí z cirkulace u všech pacientů. Téměř z nuly se po osmi týdnech vyšplhají na počet $0,7 \times 10^9/L$ u osob trpících infekcí. Normalizace obvykle nastává v průběhu dalších týdnů. Počet eosinofilů je na počátku léčby $0,05 \times 10^9/L$, u neinfikovaných osob se jejich počet zvýší jen nepatrně ($0,08 \times 10^9/L$), u infikovaných dochází opět k prudkému vzestupu na $0,21 \times 10^9/L$. Neutrofilů se také snižují, na začátku léčby je jich $0,5 \times 10^9/L$ u 3/5 pacientů s infekcí a 5/7 bez infekce. Postupně po třech týdnech dosahují $1 \times 10^9/L$, za pět týdnů $2 \times 10^9/L$ a za 11 týdnů $3 \times 10^9/L$. Normalizace neutrofilů nezávisí na přítomnosti infekce. Kladribin dokáže snížit počet vlasatých buněk z $36 \times 10^9/L$ na $8 \times 10^9/L$ s vymizením doprovodných symptomů.



Obr. 7: Imunohistochemické barvení kostní dřenež protilátkou B-ly 7. Nalevo před léčbou (infiltrace 82,5%), napravo po léčbě CdA s MRN (Konwalinka a kol. 1995).

9.1.9 Nežádoucí účinky

Vlivem imunosuprese, kterou lék vyvolává, dochází k větší náchylnosti pacienta k infekcím či ke zvýšenému výskytu lymfoidních nádorů díky dlouhotrvajícímu snížení počtu CD4 lymfocytů (Saven a kol. 1998). Již zmíněným účinkem léčby kladribinem je zhoršení stavu cytopenických pacientů. Pomoci by jim měly infuze podávané během prvního měsíce léčby. Hlavní komplikací neutropenie jsou bakteriální a plísňové infekce (Juliusson a Liliemark 1992). Bakteriální infekce bývají nejčastěji způsobené stafylokokem. Neutropenie je provázená neutropenickou horečkou s teplotami nad 38°C. Při prodlouženém trvání neutropenie (37-74 dní) se podává růstový faktor granulopoezy G-CSF (filgrastim). Nejčastější komplikací léčby bývá kultivačně negativní horečka (FUO) (16/42), bolest hlavy (8/42), nevolnost a zvracení (8/42) (Jehn a kol. 1999). Všechny pacienty užívající CdA provází také v různé míře myelosuprese, která se projevuje při snížení počtu neutrofilů na méně než 1,000/ μ L či při poklesu krevních destiček na méně než 100,000/ μ L. U jednoho pacienta z 26 léčených osob se 4 dny po léčbě rozvinula difúzní kožní vyrážka. (Tallman a kol. 1992). Studie od Chubara a Benetta (2003) dokládá, že tyto rozsáhlé kožní vyrážky jsou způsobené kombinací léčby CdA a allopurinolu. Při této kombinované léčbě byl nápadně vysoký počet postižených kožní vyrážkou. Při opakované léčbě může být vyrážka dokonce životu nebezpečná, její účinky se tlumí kortikosteroidy. Méně často také dochází k infekcím herpes simplex (5/358), herpes zoster (3/358) a cytomegalovirus (1/358) (Saven a kol. 1998).

9.1.10 Sekundární malignita

Protože CdA vlivem dlouhodobého snížení hladiny CD4+ lymfocytů působí imunosupresivně, může být zodpovědný za zvýšené riziko výskytu sekundárních malignit. Saven a kol. (1998) uveřejnili podrobné výsledky 358 dlouhodobě sledovaných pacientů (viz. tabulka 2). Polovina všech pacientů neprodělala dřívější léčbu. Z 27 pacientů, u kterých se po léčbě kladribinem objevila sekundární malignita, bylo 16 osob dříve neléčeno a 11 léčeno interferonem, splenektomií nebo kombinací obojího. Tedy předchozí léčba by neměla ovlivňovat výskyt sekundárních malignit. Ze studie vyplývá, že v souvislosti s kladribinem se objevuje častěji solidní nádor než hematopoetický.

Tab. 2: Sekundární malignity po léčbě CdA (Saven a kol. 1998).

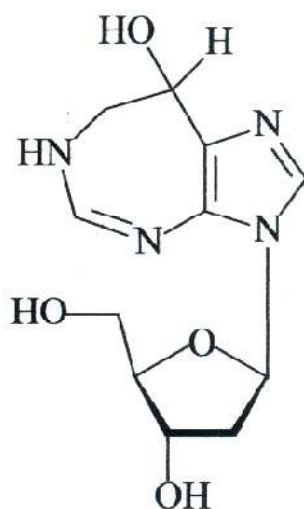
Malignita	Počet osob	Doba po zahájení užívání CdA (v průměru v měsících)
Adenokarcinom prostaty	11	20,9
Melanom	5	24,6
Adenokarcinom střeva	4	19,5
Adenokarcinom žaludku	3	39,7
Karcinom moč. měchýře	1	11
Karcinom ledvin	1	15
Neuroendokrinní nádor moč. měchýře	1	41
Nehodgkinův lymfom	1	9
Mozkový hemangioblastom	1	6

9.2 2'-Deoxycoformycin (DCF)

DCF (také pod názvem Pentostatin či Nipent) spolu s kladribinem představuje v současné době nejúčinnější lék na Vlasatobuněčnou leukémii. Pentostatin se osvědčil pro léčbu recidivujících a odolných pacientů vůči jiné léčbě, nejčastěji interferonu- α (Foon a kol. 1986). Zpočátku se pentostatin v Evropě používal k léčbě akutních leukémií, avšak díky vysoké dávce s poměrně vysokým rizikem toxicity (Smyth a kol. 1979). Dnes je již klinicky otestováno, že lze lék s maximální účinností podávat pacientům i v nízké koncentraci (Kraut a kol. 1986). Pentostatin se také úspěšně používá v léčbě mycosis fungoides a T-lymfoblastické leukémie (Tsimberidou a kol. 2004).

9.2.1 Příprava DCF

Pentostatin se získává fermentací bakteriálních kultur *Streptomyces antibioticus* či *Aspergillus nidulans*. Chemicky je látka složená z tetrahydroimidazo{4,5-d [1,3]diazepinového kruhu, spojeného s cukrem deoxyribózou (obrázek 8). Je získán (např. od společnosti Natural Products Branch) jako bílý krystalický prášek, z něj se potom připravuje bezbarvá tekutina. Celá směs se rozpouští v 4,2% NaHCO₃ a poté je sterilizována filtrací. Při skladování látky při 4°C nad 12 týdnů je obvykle testována stabilita biologické účinnosti, tedy schopnost inhibice ady deaminázy (Smyth a kol. 1980).



Obr. 8: **Pentostatin** (2'-deoxycoformycin)
(Zdroj: Robak a kol. 2009)

9.2.2 Klinické testování

Pro zjištění jaké množství dávky pentostatinu je vhodné, aniž by došlo k nežádoucím vedlejším účinkům, se vedla klinická testování na zvířatech. U psů a opic nebyla zjištěna žádná nežádoucí toxicita. Avšak mezi psem a člověkem je rozdíl z hlediska metabolismu pentostatinu. U psa je významně vyšší exkrece nahromaděného 2'-dCF (> 80%/den) ve srovnání s člověkem (32% - 48%/den) (Smyth a kol. 1980). U myši bylo pozorováno, že se malá část podávaného deoxycoformycinu mění na odpovídající mononukleotidovou formu. Taková přeměna se ale u lidí nevyskytuje. Příčinou může být větší retence léku vytvořením komplexu enzym-inhibitor (Venner a kol. 1979).

Na počátku 90. let byl zkoumán vliv pentostatinu na organogenezi gravidních krys a králíků. Nízká dávka léku v rámci 0,1 – 0,4 mg/kg není nebezpečná pro matku ani pro vývoj plodu (Luebke a kol. 1987). Avšak při dávce od 0,75 mg/kg pentostatinu dochází k úbytku váhy plodu a sníženému počtu vrhů. U 17/20 došlo k potratu či předčasnému porodu. Statisticky významná byla kosterní malformace a snížená osifikace kostí (Tukeyho test). Tyto defekty jsou způsobené tím, že placenta, která vyživuje plod, je jedním z orgánů vyznačujících se největší aktivitou pentostatinem inhibované adenosin deaminázy (Dostal a kol. 1991). Při dávce 1 mg/kg dochází 7. den těhotenství k vrcholu celkové inhibice ADA ve sliznici dělohy. Výsledkem je porušení přirozeného množství adenosinu a inosinu v buňce

(Knudsen a kol. 1990). Ukázalo se však, že pentostatin oproti kontrole nemá vliv na zvýšený výskyt malignit. Zajímavé je, že králíci, vyznačující se výraznou citlivostí, reagovali již na dávku 0,005 mg/kg. Od dávky 0,02 mg/kg už docházelo k úbytku váhy plodu 2,4 krát větším než u kontroly. Po podání 1 mg/kg již dochází k úmrtí všech testovaných králíků (Dostal a kol. 1991).

První studie DCF na pacientech byly provedeny skupinou Grever a kol. (1981). Pacienti trpěli refraktorními lymfoproliferativními onemocněními. U akutní leukémie byl lék podáván po dobu 3- 7 po sobě jdoucích dní v dávkách 0,15-1 mg/kg/d. Vlivem nepřetržité indikace docházelo k gastrointestinální toxicitě (nevolnosti, zvracení a průjem), příležitostně také k nefrotoxicitě, hepatotoxicitě, toxicitě CNS nebo dokonce k smrti.

9.2.3 Mechanismus účinku

Tato látka dokáže pracovat stejně jako kladribin selektivně, nezasahuje zdravou tkáň. Jak již bylo dokázáno pokusy u myší, k akumulaci dATP dochází nejvíce v krvi a thymu (Smyth a kol. 1978). Aktivita klíčového enzymu ADA je největší v lymfatických uzlinách, slezině, ale také v kůži. Nízkou hladinou disponují mozková kůra, játra a ledviny (Adams a Harkness 1976).

Pentostatin inhibuje syntézu DNA jen u dělících se lymfocytů. Pracuje na základě nevratné inhibice enzymu ADA, tím dochází k přeměně adenosinu a deoxyadenosinu na inosinové nukleosidové deriváty. Následně dochází k nahromadění deoxyadenosin-5'-trifosfátů v cytosolu buňky a k apoptóze (Aldinucci a kol. 2004). Deoxyadenosiny způsobují inaktivaci S-adenosyl homocysteinové hydrolázy a akumulaci S-adenosyl homocysteinu, toxickému pro lymfocyty (Hershfield a kol. 1979). Změnou poměru těchto dvou činitelů dochází k poškození DNA, RNA, ale i syntézy proteinů, inhibicí metylačních reakcí (Kredich a kol. 1979).

K poškození buněčného růstu dochází vlivem akumulace vnitrobuněčného dATP, což má za následek inhibici ADA. Účinkem dATP může dojít ke zhoršení funkce RR, který katalyzuje vznik deoxyribonukleotidů. Tím dochází k blokaci vzniku jiných dNTP a zastavení replikační vidličky díky jejich nedostatku (Cohen a kol. 1978). Může také dojít k ohrožení normální funkce terminálního enzymu deoxynukleotidyl transferázy u akutní lymfatické leukémie (Donofrio a kol. 1978). Velmi vysoké hodnoty dATP byly po léčbě pentostatinem doloženy v periferních krevních buňkách (Coleman a kol. 1977). dATP narušují přirozené vnitrobuněčné pochody a dochází k vyčerpání ATP ve tkáních a k insuficienci. Zajímavé je, že u dětí trpících vrozenou chorobou SCID nedochází po léčbě pentostatinem k selhávání funkce orgánů. Lidé s touto nemocí způsobenou vrozenou nedostatečností ADA se

biochemicky liší od jiných pacientů, a přestože dochází ke zvýšené hladině dATP, množství exkrece v moči je velmi malé (0,03 g/den) (Donofrio a kol. 1978) na rozdíl od leukemických pacientů (nad 1,4 g/den), kteří měli vysoký poměr dATP/ATP v krvi, značící pokles leukemické buněčné masy. Při tomto zvýšeném množství dATP bylo nutné udržovat vysoký objem moči, aby se nesrážel v parenchymu ledvin (Grever a kol. 1981). Většina DCF se vyloučí nezměněná s močí. Platí pravidlo, že se jeho obsah v moči zvyšuje s délkou a intenzitou léčby (Major a kol. 1981).

9.2.4 Křížová rezistence

Tento případ rezistence se vyskytuje, když nádorové buňky ztratí svou citlivost vůči jednomu cytostatiku a současně vzniká rezistence i na jinou, často strukturně velmi podobnou látku (Klener 2002). Příkladem může být rezistence na kladribin a zároveň i na thapsigargin, lakton, indukující u buněk apoptózu (Chandra a kol. 2002).

Pentostatin versus kladribin

Navzdory blízké strukturní podobnosti, tyto dvě látky křížovou rezistenci postrádají. Saven a Piro (1993) uvedli studii, ve které 5 pacientů bylo rezistentních k léčbě pentostatinem. 4 z nich byli přeléčeni kladribinem, s výslednou kompletní remisí.

Pentostatin versus interferon- α

Také v tomto případě nebyla potvrzená křížová rezistence. Jsou známy případy úspěšné léčby pacientů pomocí DCF, kteří byli dříve neúspěšně léčeni interferonem- α (Foon a kol. 1986).

9.2.5 Dávkování

Během studií na zvířatech bylo ustanoveno, že nejvhodnější dávka pro léčbu pentostatinem u nemocných s vlasatobuněčnou leukémií je 4 mg/m². Dávky se opakují každé dva týdny, látka je vpravena do těla najednou intravenózní injekcí. Vyšší dávky se kvůli riziku toxicity neindikují, dochází hlavně k neurologickým potížím (Cheson a kol. 1994). Nižší dávku je možné s poměrně uspokojivým výsledkem podat pacientům, které mají omezenou funkci orgánů. Nejčastější problém bývá renální insuficience s doporučenou dávkou 2 mg/m² (Kraut a kol. 1986) nebo nízký clearance kreatininu s možnou dávkou pouze 2 mg/m² (Ribeiro a kol. 1998). Počet cyklů léčby DCF je individuální, záleží na vývoji odpovědi na lék.

9.2.6 Účinky proti HCL

Nejdelší sledování pacientů provedli Flinn a kol. (2000). Po 9,3 letech sledování lze potvrdit, že pentostatin u nemocných s vlasatobuněčnou leukémií vyvolává dlouhodobou rezistenci. Z 241 studovaných osob došlo u 173 (72%) pacientů k celkové odpovědi. Předchozí léčba zahrnovala pouze interferon α (87 lidí), ostatní (154) byli léčeni od počátku pentostatinem. Bez ohledu na počáteční léčbu došlo do 5ti let k recidivě u 32 lidí (18%), do 10ti let již u 33% pacientů. Studie také prokázala, že léčba je významně úspěšnější u osob mladších 55 let (121 osob, 93% úspěšnost), než u osob nad 55 let (120, 68%). Dearden a kol. (1999) udělali studii porovnávající oba purinové deriváty. Pentostatin vyvolal u 165 pacientů 82% ÚR a 15% ČR. Recidivovalo 24% pacientů v průměru za 71 měsíců. Po podání kladribinu mělo 84% pacientů ÚR a 16% ČR. Výsledky trvání remise vyšly méně příznivě, v průměru 45 měsíců. Španělská studie od Rafael a kol. (2000) podrobila léčbě 78 pacientů HCL. 43 pacientů podstoupilo léčbu již před pentostatinem. Po sedmi cyklech podání DCF došlo u 56 osob k celkové odpovědi (72%), 13 pacientů projevilo částečnou odpověď (16%). Celková senzitivita na léčbu je 88%. 1 pacient s HCL-V dostal ČR, u druhého po šesti cyklech léčba selhala a po šesti měsících zemřel na následky zápalu plic. Z 56 ÚR 11 osob prodělalo recidivu nemoci, v průměru za 29 měsíců. U všech pacientů s diagnostikovanou ČR došlo k progresi nemoci, a to už od 2. – 19. měsíce od ukončení léčby.

Ribeiro a kol. (1999) léčili 50 pacientů s HCL, 1 pacient měl HCL-V. opět se potvrdilo, že tato variantní podoba Vlasatobuněčné leukémie je silně odolná vůči léčbě a téměř vždy recidivuje. Pacient sice získal částečnou odpověď, ale po roce došlo k recidivě nemoci a následně ke smrti vlivem infekce. 32/50 pacientů prodělalo dřívější terapii (IFN- α a CdA). Senzitivita na léčbu byla vysoká, 48 lidí (96%). Kompletní odpověď mělo ale jen 22 pacientů (44%), dobrá částečná odpověď (dČR=18 pac.) definovaná tolerancí množstvím infiltrace HC buňkami v kostní dřeni méně než 5%. Klasická částečná odpověď byla pozorována u 8 osob (16%). V mediánu 33 měsíců dostalo 5 pacientů recidivu, všichni s již dříve prodělanou léčbou. Pacienti s dČR neprodělali recidivu, pouze jeden s HCL-V, který později zemřel. Kromě něj ještě zemřelo 6 pacientů (14%), pouze 2 pacienti vlivem léčby pentostatinem. Nižší počet výsledných kompletních odpovědí u této studie vzhledem k ostatním, je nejspíše způsoben závažnějším vývojem nemoci pacientů, rozsáhlým výskytem cytopenie a jinými chorobami (cirhóza jater, plicní infekce) a také skutečností, že více než polovina pacientů byla dříve léčena interferonem- α . Menší studie ze začátků vývoje DCF ukazují velmi pozitivní bilance kompletní odpovědi a délku remise pacientů. Avšak tomuto pozitivnímu výsledku

mohlo dopomoci menší množství léčených pacientů. Kraut a kol. (1986) došli k vynikajícím výsledkům také proto, že zkoumané osoby byly v průměru ve věku 53 let, v rozmezí 37 – 70 let. Z 10 pacientů 9 projevilo v průměru po šesti léčebných cyklech kompletní odpověď. 2 pacienti prodělali recidivu po 12 a 8 měsících. Celková pozitivní bilance přežití a senzitivity na léčbu jen potvrzuje již zmíněnou výhodu věku pod 55 let.

Tab. 3: Přehled výsledků vybraných studií léčby pentostatinem.

Autor	Počet osob	Odpověď	Recidiva	Předchozí léčba
Dearden a kol. 1999	165	ÚR=135 (82%) ČR=25 (15%)	40 (24%) za 71 měsíců	INF α =115 Splk=12
Rafael a kol. 2000	78	ÚR=56 (72%) ČR=13 (16%)	11 (14%) za 29 měsíců	INF α =22 splk.=6 INF α +splk.=14 CdA=1
Ribeiro a kol. 1999	50	ÚR=22 (44%) dČR=18 (36%) ČR=8 (16%)	5 (10%) za 33 měsíců	INF α =32 CdA=1 splk.=13
Kraut a kol. 1986	10	ÚR=9 (90%)	2 (20%) za 12 a 8 měsíců	splk.=6 chlorambucil nebo merkaptopurin=3

Vysvětlivky: ÚR=úplná remise, ČR=částečná remise, dČR=dobrá částečná remise, MR=minimální remise, splk.=splenektomie, INF α =interferon α , CdA=kladribin.

9.2.7 Nežádoucí účinky

Pentostatin může prostřednictvím zvyšování hladiny dATP vykazovat toxicitu v orgánech těla. Nejčastěji působí na centrální nervovou soustavu, játra a ledviny. Vyvolává letargii,

zmatenost a záchvaty. Je dokázáno, že pokud se hladiny dATP a ATP vyrovnají, dojde k vymizení těchto obtíží (Grever a kol. 1981). Bylo zjištěno, že při podání vysokých dávek DCF (nad 4 mg/m²) může dojít ke vzniku podobných symptomů jako u SCID, tedy lymfopenie, atrofie thymu, mandlí a žláz, abnormální funkce T a B lymfocytů (Murphy a kol. 1984). K vážnému případu toxicity CNS došlo u 2 lymfoproliferativních pacientů (celkem 10), kteří měli již před léčbou problémy s ledvinami. V moči se naměřila vysoká dávka vyloučeného deoxyadenosinu i adenosinu, který by se normálně vylučovat neměl. Došlo k akumulaci dATP a vyčerpání ATP v cirkulujících erytrocytech. To vedlo ke zvýšené hladině deoxyadenosinu v mozkomíšní tekutině. Tato toxicita měla vliv na pacienta v podobě progresivní letargie a změny chování, pozorované již po 2. týdnu léčby. Poruchy CNS ale bývají reverzibilní, pokud dojde k vyrovnání hladin ATP a dATP, dojde i k obnovení přenosu v mozku pomocí mediátoru, jehož složkou je právě adenosin (Grever a kol. 1981). To, že se dATP v těle neshromažďuje jen v periferní krvi, dokládá pitva 8 pacientů léčených DCF. V jejich slezině, ledvinách a játrech se našla ve srovnání se zdravými orgány jiných jedinců výrazně zvýšená hladina dATP (Grever a kol. 1981). S neutropenií související neutropenické horečnaté stavy se vyskytovaly často, u 5/78 pacientů si komplikace vyžádaly léčbu pomocí G-CSF. Také ve spojení s pentostatinem je obvyklá herpes infekce (2/78 pac. ; 2,5 %), či vyrážka (4/78; 5,1 %). Pravidelně se ve studiích objevují případy nevolností a zvracení (5/78; 6,%) (Rafael a kol. 2000). Protože je léčba pentostatinem spojená s poměrně rychlým vymizením HC buněk z krve, může dojít ke krátkodobé anémii, trombocytopenii a neutropenii (Ribeiro a kol. 1999). Ke vzniku autoimunitní trombocytopenie nebo hemolytické anémie dochází u HCL jen vzácně, ale lze jej úspěšně vyléčit monoklonální protilátkou rituximabem (Hensel a Ho 2003). Celkem k infekčním komplikacím dochází u každé studie různě často, v rozmezí 0 – 50 % pacientů, zatímco k sekundárním malignancím u 2,5 – 20 % pacientů (Ribeiro a kol. 1999). U analýzy 350 pacientů se sek. malignita objevila u 26 (7,4 %) lidí, v průměru 7 let po léčbě pentostatinem. Zvýšení vzniku sekundárních malignancí bylo zaznamenáno, avšak není statisticky významné (0,83 O/E; P=0,7;95 % konfidenční interval) (Kurzrock a kol. 1997).

9.2.8 Krevní obraz

Na počátku léčby DCF dochází k výraznému poklesu lymfocytů, zvláště řady T, CD4 a CD8. Tento pokles často trvá po celou dobu léčby, naopak NK buňky jsou proti vlivu pentostatinu odolné. (Urba a kol. 1989). Pro HCL je charakteristický nález monocytopenie (Janckila a kol. 1982). V americké studii bylo pozorováno, že u osmi silně monocytopenických pacientů

(méně než 100 monocytů/ μ l) došlo po léčbě k jejich zvýšení v periferní krvi na 250 – 1080 monocytů/ μ l (Kraut a kol. 1986). Ve studii 18 léčených osob s refraktorními malignitami se u všech objevila lymfocytopenie. Když byl lék podáván v jednorázové dávce 0,1 mg/kg, již po 48 hodinách došlo ke snížení lymfocytů cirkulujících v krvi o polovinu. Po té samé dávce, podávané ve větší intenzitě 5 po sobě jdoucích dní, došlo k redukci lymfocytů o 88% a 97%. Se zvyšováním dávky léku a intenzity podávání se lymfocytopenie u pacientů zvyšovala. Asi po 2 týdnech se počty lymfocytů vrátily do normální hladiny (Smyth a kol.). Hladina hemoglobinu po užití DCF v prvních 4 týdnech mírně klesla (o 10 g/l). Postupně však docházelo k opětovnému zvýšení, dokonce o 35% nad původní hladinu před léčbou do 16 týdnů. Množství krevních destiček díky léčbě postupně rostlo, do 16 týdnů se hladina u 11/14 pacientů vrátila do normálu. Absolutní počet eozinofilů a bazofilů se vlivem léčby příliš nemění (Bakul a kol. 1989). Ukázalo se, že deoxycoformycin též nemá vliv na hladinu krevní urey, alkalickou fosfatázu, alaninovou transaminázu, ani na hladiny bilirubinu. Nejvýraznějším vedlejším účinkem pentostatínu u studie 78 pacientů s HCL byla neutropenie a s tím související neutropenická horečka (22 pacientů, 28%) (Rafael a kol. 2000). Je také znám případ vzniku MDS (Myelodysplastický syndrom) v průběhu remise HCL právě po užití deoxycoformycinu. Došlo ke vzniku refraktorní anémie s prstencovými sideroblasty. Změny tvaru postihovaly erytroidní i granulocytární řadu, klesl počet neutrofilů. Příčinou může být dřívější podávání alkylačních činitelů, ale také vyšší věk pacienta (76 let) (Psiachou-Leonard a Bain, 1998).

U všech 14 pacientů, kteří reagovali na léčbu úplnou remisí, klesl počet HC buněk v periferní krvi o 50 – 95 % do 1 týdne, k úplnému vymizení došlo po 12. týdnu léčby (Bakul a kol. 1989).

9.2.9 Kostní dřev

Jak jsem již zmínila, kostní dřev bývá často vlivem infiltrace HC buněk hypercelulární. Po léčbě DCF dochází v kostní dřev k úbytku HC buněk pomaleji než v periferní krvi (po 24 týdnech u 11/14 osob). To je způsobeno poklesem buněčnosti po léčbě z původních 65% na 40%. Pokles stále pokračoval, v 56. týdnu po léčbě již činil 30 – 20%. Erytrocyty, granulocyty a megakaryocyty poté regenerovaly a po 16 týdnech se u 11/14 osob vrátily do normální hodnoty. Postupně dochází k normalizaci zvýšeného počtu retikulinu (>3+) u všech pacientů, kteří měli jeho hodnoty zvýšeny (na 1+ - 2+). Nebyly pozorovány žádné dysplastické změny v hematopoetických buňkách KD (Bakul a kol. 1989).

9.3 Fludarabin (FA)

Fludarabin monofosfát je deoxyadenosinový analog, podobně jako kladribin. Mezi jeho alternativní názvy patří 9-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenin 5'-monofosfát 2-fluoro-ara-AMP, a NSC 312887. Původně byl vyroben Montgomerym a Hewsonem roku 1969. Již ukázal svou protinádorovou účinnost u chronické lymfatické leukémie (CLL) a jiných indolentních lymfomů. Používá se hlavně k léčbě CLL (57% reagujících pacientů) a vyznačuje se rychlým nástupem s minimální vedlejší toxicitou (Keating a kol. 1989).

FA se komerčně vyrábí ve formě monofosfátu. Kvůli lepší a rychlejší propustnosti přes membránu dochází k jeho defosforylaci, aby mohl být přenesen nukleosidovými přenašeči (Molina a kol. 2003). V buňce je potom přeměněn pomocí dCK nebo dGK na trifosfát, který se stává aktivní metabolickou formou, schopnou cytotoxicity (Rodriquez a kol. 2002). Tu vykonává inkorporací do DNA řetězce. Bylo zjištěno, že funguje jako předčasný terminátor, 94% fludarabinu bylo napojeno na 3' konec DNA řetězce. Další možnost mechanismu je, že F-ARA soutěží o inkorporaci na A místa s dATP, čímž inhibuje DNA polymerázu (Huang a kol. 1990). FA-MP se na FA přemění do 5 minut během intravenózní infuze. Vrchol vnitrobuněčné hladiny fludarabinu byl pozorován asi 3 - 4 hodiny po dokončení infuze. FA-MP je obvykle podáván v dávce 25 mg/m²/d v 30 minutových infuzích nebo injekcích 3 – 5 dní, opakování každých 3 – 5 týdnů (Adkins a kol. 1997).

Asi vůbec první studii o účinku fludarabinu na HCL provedli v roce 1991 Kantarjian a kol. na třech pacientech. Jeden z nich měl již známou obtížně léčitelnou variantní formu HCL. Dva pacienti dosahli částečné odpovědi (druhý pacient a HCL-V) a třetí reagoval minimální odpovědí. Přesto se ukazuje, že další purinový derivát, již třetí v řadě, má výsledky v léčbě HCL. Pozitivní je také to, že fludarabin postrádá křížovou rezistenci k ostatním purinovým derivátům i k interferonu. Výsledky tohoto léku však nedosahují takové vysoké účinnosti jako v případě kladribinu a pentostatinu, množství klinických studií na pacientech HCL je proto velmi omezeno.

V současné době se konají klinické zkoušky k ověření tří nových purinových derivátů: clofarabin, forodesin a nelarabin. Užitečnost ukázaly hlavně proti T-lymfoproliferativním onemocněním, avšak už existuje několik studií s pozitivními výsledky proti B-buněčné řadě.

9.4 Minimální reziduální nemoc po léčbě purinovými deriváty

Wheaton a kol. (1996) publikovali studii 39 HCL nemocných léčených pomocí kladribinu. Všichni dosáhli kompletní remise. Tři měsíce po léčbě se z biopsie kostní dřeně imunohistochemickými metodami zjistila MRN u 5/39 pacientů (13%). 40% MRN pozitivních pacientů bylo po třech měsících postiženo recidivou nemoci. Naopak z pacientů, kteří měli MRN negativní, recidivovalo 7%. Výsledky tedy mohou být důkazem, že průkaz MRN v kostní dřeni může předpovídat návrat nemoci.

Ve studii od Tallmana a kol. (1999) bylo zahrnuto 66 pacientů léčených pentostatinem nebo kladribinem. Ukázal se statistický rozdíl v časovém rozmezí od vyšetření MRN po první známky relapsu mezi MRN+ a MRN- pacientů. V remisi se po dobu 4 let u MRN+ pacientů udrželo 55%, u MRN- potom 88 %. Pro srovnání účinnosti obou léků byl výskyt MRN u kladribinu 13% (5/39), u pentostatinu 26% (7/27). Opět se v této studii potvrzuje, že MRN má vliv na návrat nemoci (50% z MRN+, 6% z MRN-).

10. Nové léčebné metody

Asi 10% pacientů je primárně rezistentních k purinovým derivátům. U jiných se může vyvinout získaná rezistence v pozdějším stádiu nemoci. Rezistence k purinovým derivátům většinou znamená i rezistenci k IFN- α . Pro tyto pacienty je vhodné zavést léčbu s monoklonálními protilátkami či rekombinantními imunotoxiny. Přinášejí pozitivní výsledky až u 30% nemocných (Hagberg a kol. 2001). Také hrozbu minimální reziduální nemoci, která se dříve či později objeví téměř u všech léčených pacientů HCL v podobě recidivy, je možné až na 94% vymýtit.

10. 1 Rituximab (C2B8)

Z monoklonálních protilátek je nejlépe studovaná v oblasti HCL. Rituximab je chimérický imunoglobulin G1, monoklonální protilátka, zaměřená na antigen CD20. Ten je exprimován na většině B-maligních buňkách leukémií a lymfomů (Reff a kol. 1994). Tato protilátka se váže na C1q složku, což je protein, který spojuje Fc oblast imunoglobulinu se systémem komplementu (Emanuel a kol. 1982). C1q se spojuje s rituximabem díky afinitě k imunoglobulinu G. Tento výsledný komplement je podmínkou pro účinek léku, tedy rozpad rozpoznané buňky vyvoláním apoptózy (Reff a kol. 1994).

Studie od Thomas a kol. (2003) prokázala účinek u recidivujících i primárně rezistentních pacientů HCL po užití purinových derivátů. Rituximab dostávalo 15 pacientů 375 mg/m² týdně po dobu 8 týdnů. Celková úspěšnost citlivosti na lék byla 80%. 8 pacientů mělo ÚR (53%), 2 dosáhli ÚR s doloženou MRN a 13% mělo PR. 5/12 pacientů utrpělo progresi nemoci. Cervetti a kol. (2004) zjišťovali účinek rituximabu na deseti pacientech po léčbě kladribinem. Všichni měli prokázanou MRN. Po čtyřech dávkách rituximabu byla u všech úplná hematologická remise, molekulární (vyšetřená pomocí PCR) se zvýšila. U všech kromě jednoho pacienta, došlo k významné redukci MRN. Toxicita je minimální, vyskytl se případ eozinofilie po ukončení léčby (Else a kol. 2007).

10. 2 BL22

HC buňky též silně vyjadřují CD22. Protilátkou k této adhezní molekule je rekombinantní imunotoxin BL22 složený z variabilní oblasti (Fv) s protilátkou k CD22 (RFB4), připojené k části exotoxinu z *Pseudomonas* PE38. 11/16 pacientů po této látce získá ÚR v rozsahu 1 – 9 cyklů léčby v různých dávkách. 2 pacienti měli ČR a 1 pacient MR. MRN byla detekována poze u 1 pacienta. Avšak 3 pacienti měli vážné toxické problémy, spojené s vyšší podávanou dávkou (Kreitman a kol. 2001).

10. 3 LMB-2

Je to další rekombinantní imunotoxin, zaměřený proti buňkám vyjadřujícím CD25. Je vytvořen sloučením Fv části z anti-Tac (anti-CD25) protilátky s 38 kD *Pseudomonas* exotoxinu A v bakterii *Escherichia coli*. Má vůči HCL slibné výsledky, avšak vyzkoušen byl jen na omezeném počtu pacientů. Nelze ho použít pro HCL variantní, jelikož její buňky CD25 neexprimují. První fáze testování proběhla v roce 1996. Následně se podrobili léčbě 4 pacienti po předchozí léčbě purinovými deriváty. Po 1 – 2 cyklech léčby se u tří dostavila ČR a u jednoho ÚR. Počet cirkulujících HC buněk se podařilo snížit o 99% (Kreitman a kol. 1999).

11. Srovnání účinku purinových derivátů s ostatními léčebnými metodami

V tabulce 4 je souhrn úspěšnosti jednotlivých léků, které se v současnosti proti vlasatobuněčné leukémii používají. Splenektomie má vysokou účinnost v periferním krevním obraze, ale na kostní dřeň a krevní destičky působí minimálně. 30% pacientů se neobejde bez další léčby. IFN- α kvůli intenzivnímu dávkování díky nízké perzistenci vyvolává toxické problémy. Purinové deriváty mají vysokou stabilní účinnost s dlouhotrvající remisí, ve

srovnání s ostatními léky. Pentostatin se zdá být šetrnější vzhledem k následným infekčním problémům díky nevyhnutelné imunosupresi. Oba silně působí i na buňky v kostní dřeni, avšak stále je vysoké riziko MRN s reziduálními buňkami do 5%. V 90. letech nastal rozvoj monoklonálních protilátek, které výrazně snižují procento reziduálních buněk v kostní dřeni, navíc fungují i v případech, kde purinové deriváty selhaly. BL22 je slibná protilátka, stále ještě málo klinicky prozkoušená. Její výjimečnost ale dokládá skutečnost, že dokázala jako jediný lék vyvolat u HCL variantní úplnou remisi.

Tab. 4: Souhrn nejvýznamnějších léčebných metod HCL.

Autor	Léčba	Počet osob	Účinnost	Odpověď	Recidiva
Golomb a kol. (1983)	splenektomie	65	100%	ÚR=27 (41,5%) ČR=38 (58,5%)	21(32%) úmrť bez další léčby
Quesada a kol. (1986)	interferon- α	30	87%	ÚR=9 (30%) ČR=17 (57%)	10 (33%) za 3-10 měs.
Robak a kol. (1999)	kladribin	103	96%	CR=75 (77%) PR=18 (19%)	20 (22%) za 37 měs.
Dearden a kol. (1999)	pentostatin	165	97 %	ÚR=135 (82%) ČR=25 (15%)	40 (24%) za 71 měsíců
Thomas a kol. (2003)	rituximab	15	80%	ÚR=10 (67%) ČR=2 (13%)	5 (33%) za 20 měs.
Kreitman a kol. (2001)	BL22	16	88%	ÚR=11 (69%) ČR=2 (13%) MR=1 (6%)	3 (19%) za 9 měs.

12. Diskuze

Z výsledků zde uvedených studií vyplývá, že neúčinnější léčbou HCL jsou v současnosti kladribin, pentostatin a stále ještě interferon- α , díky dlouhotrvající remisi. Právě díky purinovým derivátům se stala tato nemoc dobře léčitelnou s dlouhodobým přežíváním a bez příznaků choroby. V krátkosti zmíněný fludarabin je široce používán proti CLL, ale u HCL zatím nedokázal vyvolat úplnou rezistenci. Navíc první studie, která se tímto novým purinovým purinovým derivátem zabývala, se datuje do roku 1991. To je období rozkvětu monoklonálních protilátek, které mají mnohem příznivější účinky a tím pádem příznivější počet věnovaných klinických studií.

Kladribin a pentostatin, kteří jsou hlavním tématem této rešerše, produkuje nejvíce úplných remisí. Kladribinu je věnováno více klinických studií, hlavně kvůli různorodému dávkování a možnostem vpravení do těla. Protože k dosažení usmrcení maximálního počtu buněk je potřeba prodloužená inkubace CdA s lymfocyty, neúčinnější se ukázal v podání kontinuální infuzí po dobu 7 dní (tabulka 1). Ale nepřetržité působení tohoto cytotoxinu se bohužel projevuje i oslabením imunity jedince a výskytem infekčních onemocnění, zvláště závažné mohou být kožní vyrážky difúzního charakteru. DCF infekce způsobuje také, ale v menším měřítku, protože je podáván delší dobu a v dlouhých intervalech. Právě infekce jako vedlejší efekt účinku léčby lymfoproliferativních onemocnění, je nejdiskutovanějším problémem. Má významný vliv na vývoj léčby. Pokud člověk trpí jakoukoliv infekcí ještě před léčbou, je účinnost purinového derivátu významně snížena. Správně by do skupiny léčených pacientů měl být přijat jen ten pacient, který má v pořádku hladinu neutrofilů v krvi. V mnohých studiích tomu ale tak není, protože počet nemocných s HCL je omezený. Proto například zde u DCF, vychází lék ve většině studií jako méně účinný než kladribin. Avšak z několika studií, které jsem bohužel neměla k dispozici, vyplývá vysoká, dokonce vyšší účinnost DCF než u CdA, díky dříve neléčeným pacientům s absencí infekčních problémů. Stav pacienta přímo koreluje s počtem předchozí neúspěšné léčby. Průměr počtu již dříve léčených pacientů z uvedených studií toto tvrzení dokládá: u kladribinu 54% pacientů, u pentostatinu 72%. Účinnost léčby se součtem všech odpovědí vychází 96% u CdA a 93% u DCF. Trvání remise ale vychází u obou léků srovnatelně. Studie od Dearden a kol. (1999) však uvedla, že k recidivě dojde podstatně rychleji po kladribinu (45 měsíců) než po pentostatinu (71 měsíců).

Zvýšení výskytu sekundární malignance vlivem léčby nebylo v případě DCF v žádné studii signifikantně dokázáno. U CdA byla incidence sek. malignance průkazná ve studii od Saven a

kol. (1998). 8% pacientů z 358 bylo postiženo různými nádorovými onemocněními, ale pouze jeden postižením hematopoézy (viz. tabulka 2). Nejpočetněji se vyskytovaly adenomy, konkrétně adenom prostaty.

Minimální reziduální nemoc vzniká při zjištění méně než 5% maligních buněk v kostní dřeni v úplné remisi. Po rozvoji takových citlivých metod, jako je například PCR, se zjistil jeho hojný výskyt i po залечení purinovými deriváty. Ve studii od Tallmann a kol. (1999) bylo procento výskytu MRN vyšší u pentostatinu: 26%, kladribin: 13%. Také se potvrdilo, že MRN může předpovídat recidivu nemoci: 50% pacientů s MRN+, 6% s MRN-.

Kromě celkového stavu pacienta bez probíhající infekce, je dalším důležitým prognostickým faktorem pro úplnou remisi věk. Podle dlouhodobé studie Flinn a kol. (2000) mají vyšší pravděpodobnost úspěšné léčby pacienti nad 55 let.

Purinové deriváty mají velmi vysokou účinnost proti HCL ve srovnání se staršími i těmi novějšími metodami, jak je zřejmé z tabulky 4. Podle nejvýznamnějších studií je počet respondentů pro kladribin 96% (Robak a kol. 1999) a pro pentostatin 97% (Dearden a kol. 1999). Kvalitu odpovědi také ovlivňuje prodělaná splenektomie, díky níž jsou vyšší poměry ÚR při léčbě purinovými deriváty. Negativní stránka operace je vyšší riziko výskytu infekce. Poměry recidivy za 5 a 10 let u DCF byly 24% a 42%, u CdA 33% a 48%. Procento dožití se 10 let bylo 96% u DCF a 100% u CdA skupiny (Else a kol. 2005). Studie Grever a kol. (1995) přímo porovnála účinnost interferonu- α a pentostatinu u dříve neléčených pacientů. Úplnou rezistenci získalo jen 11% pacientů léčených IFN- α , po pentostatinu mělo ÚR 76%. Ukázalo se také delší trvání remise po pentostatinu, avšak vyšší výskyt myelosuprese.

Ačkoliv jsou purinové deriváty vysoce účinné, 10 – 20% pacientů zůstává stále odolných vůči léčbě. Možnosti léčení pro odolné či stále recidivující pacienty ještě nebyly úplně vyřešeny. Nejčastěji se používá opětovné přeléčení purinovými deriváty s dobrou účinností. Saven a kol. (1998) uvedli výsledky přeléčení po první recidivě po CdA. 62% dostalo úplnou remisi a 26% částečnou remisi. Nicméně poměry ÚR se po každém cyklu snižují a trvání remise je kratší. Přeléčení interferonem není příliš účinné, pacient často umírá na progresi nemoci (Tallman a kol. 1996). Poslední dobou se ale stále častěji používána kombinovaná léčba purinového derivátu s monoklonální protilátkou rituximabem. Výsledky jsou vynikající. Z 8 pacientů odolných k léčbě HCL, mělo po této kombinaci léků 7 úplnou remisi a 1 remisi částečnou. Navíc u žádného z nich nebyla zjištěna MRN (Else a kol. 2007). Rituximab byl první vlaštvou ve výzkumu protilátek k léčbě HCL. Jeho účinnost podnítila další výzkumy,

objevila se účinnost i u dalších protilátek BL22 a LMB-2. Jejich hlavní výhodou je přítomnost minimálních vedlejších účinků a redukce MRN. Poměry úplných rezistencí nedosahují takové výše jako u purinových derivátů, což může být způsobeno pokročilou nemocí s rozsáhlým nálezem v kostní dřeni. Výhodnou vlastností LMB-2 je, že nezpůsobuje hematopoetickou toxicitu. Mohl by tedy pomoci pacientům s již špatným stavem kostní dřene. BL22, reagující na antigen CD22, ukázal klinickou aktivitu i vůči silně odolné variantní HCL, která postrádá CD25. Jako první dokázal vyvolat úplnou remisi.

Podle získaných výsledků účinku jednotlivých léků by počátečním lékem na začátku nemoci měl být pentostatin, kvůli dlouhodobé remisi. U recidivujících pacientů bych použila kombinaci rituximabu a kladribinu.

13. Závěr

V porovnání výsledků úplné rezistence a celkové reakce na léčbu s ostatními léky, jsou jednoznačně nejvhodnější volbou purinové deriváty. Poskytují nejdelší rezistenci, dokonce i nad 15 let bez recidivy. Díky těmto látkám se Vlasatobuněčná leukémie stala jednou z nejlépe léčitelných lymfoproliferativních chorob. Vidím slibnou budoucnost i v rekombinantních protilátkách, které se v současné době klinicky testují a jejich optimální dávkování ještě není ověřeno. V jejich kombinaci s purinovými deriváty dochází k eliminaci nepříznivých účinků, jako je infekce vlivem myelosuprese a snížení MRN, která je významným spouštěčem recidivy.

14. Seznam použitých zkratk

ADA – adenosin deamináza

APAF-1 (AIF) – apoptotický proteázový aktivační faktor

ATP – adenosin trifosfát

CD – povrchový znak (cluster of differentiation)

2- CdA – 2-chlorodeoxyadenosin (kladribin)

2-CdA TP – 2-chlorodeoxyadenosin trifosfát

CLL – chronická lymfatická leukémie

ČR – částečná remise

dATP – deoxyadenosin trifosfát

dCK – deoxycytidin kináza

dGK – deoxyguanosin kináza

DCF – deoxycoformycin (pentostatin)

dČR – dobrá částečná odpověď

DNAP – DNA polymeráza

FUO – kultivačně negativní horečka

G-CSF – faktor stimulující proliferaci granulocytů

HCL – vlasatobuněčná leukémie

HCL-V – variantní vlasatobuněčná leukémie

HC – hairy cell (vlasatá buňka)

HLA-DR – hlavní histokompatibilní komplex

Ig – imunoglobulin

IFN- α – interferon- α

KD – kostní dřev

MR – minimální remise

MRN – minimální reziduální nemoc

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

NK buňky – natural killer buňky

PARP – polymeráza poly ADP-ribózy

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RR – ribonukleotid reduktáza

SAHM – 5-adenosylhomocystein hydroláza

TRAP – tartát rezistentní kyselá fosfatáza

SCID – severe combined imunodeficiency

ÚR – úplná remise

15. Literatura

Adams A, Harkness RA (1976) Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. *Clinical & Experimental Immunology* 26: 647–649

Adkins JC, Peters DH, Markham A (1997) Fludarabine. An update of its pharmacology and use in the treatment of haematological malignancies. *Drugs* 53: 1005-1037

Albertioni F, Juliusson G, Liliemark J (1993) On the bioavailability of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA). The influence of food and omeprazole. *European Journal of Clinical Pharmacology* 44: 579-82

Aldinucci D, Poletto D, Lorenzon D, Nanni P, Degan KO, Rapana B, Pinto A; Gattei V (2004) CD26 expression correlates with a reduced sensitivity to 2'-deoxycoformycin-induced growth inhibition and apoptosis in T-cell leukemia/lymphomas. *Clinical Cancer Research* 10: 508-520

Dalal BI, Freier L, Johnston JB, Merry CC, Israels LG (1989) Peripheral blood and bone marrow changes following 2'-deoxycoformycin therapy in Hairy cell leukemia. *Cancer* 63: 14-22

Bernstein L, Newton P, Ross RK. (1990) Epidemiology of hairy cell leukemia in Los Angeles County. *Cancer Research* 50: 3605–3609

Beutler E, Sipe JC, Romine JS, Koziol JA, Mcmillan R, Zyroff J (1996) The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 1716-1720

Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA (1958): Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood* 13: 609-63

Bouroncle BA (1979) Leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia) *Blood* 53: 412-436

Bouza E, Burgaleta C, Golde DW (1978) Infections in hairy-cell leukemia. *Blood* 51: 851-859

Burns GF, Nash AA, Worman CP, Barker CR, Hayhoe FGJ (1977) A human leukaemic cell expressing hybrid membrane phenotypes. *Nature* 268: 243-245

Carrera CJ, Terai CH, Lotz M, Curd JG, Piro LD, Beutler E, Carson DA (1990) Potent toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward human monocytes in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 86: 1480-1488

Carson DA, Wasson DB, Taetle R, Yu A (1983). Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood* 62: 737-743

Carson DA, Wasson DE, Beutler E (1984) Antileukemic and immunosuppressive activities of 2-chloro-2-deoxyadenosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 2232

- Carson DA, Carrera CJ, Wasson DB, Yamanaka H (1988) Programmed cell death and adenine deoxynucleotide metabolism in human lymphocytes. *Advances in Enzyme Regulation* 27: 395-404
- Clavel J, Mandereau L, Cordier S, Goaster CL, Heamon D, Conso F, Flandrin G (1995) Hairy cell leukaemia, occupation, and smoking. *British Journal of Haematology* 91: 154-161
- Clavel J, Hemon D, Mandereau L, Delemotte B, Severin F, Flandrin G (1996) Farming, pesticide use and hairy-cell leukemia. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 22: 285-93
- Cohen A, Hirschhorn R, Horowitz SD, Rubinstein A, Polmar SH, Hong R, Martin DW (1978) Deoxyadenosine triphosphates as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 472
- Coleman MS, Donofrio J, Hutton JJ, Daoud A, Lampkin B, Dyminski I (1977): Abnormal concentrations of deoxynucleotides in adenosine deaminase (ADA) deficiency and severe combined immunodeficiency disease (SCID). *Blood* 50: 292
- Costello K, Sipe JC (2008) Cladribine Tablets' Potential in Multiple Sclerosis Treatment. *Journal of Neuroscience Nursing* 40: 275-280
- Dearden C E, Matutes E, Hilditch BL, Swansbury GJ, Catovsky D (1999) Long-term follow-up of patients with hairy cell leukaemia after treatment with pentostatin or cladribine. *British Journal of Haematology* 106: 515-519
- Donofrio J, Coleman MS, Hutton JJ, Daoud A, Lampkin B, Dyminski J (1978) Overproduction of adenine deoxynucleosides and deoxynucleotides in adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency. *Journal of Clinical Investigation* 62: 884
- Dostal LA, Brown S, Bleck J, Anderson JA (1991) Developmental toxicity of pentostatin (2'-deoxycoformycin) in rats and rabbits. *Teratology* 44: 325-334
- Else M, Ruchlemer R, Osuji N, Giudice ID, Matutes E, Woodman A, Wotherspoon A, Swansbury J, Dearden C, Catovsky D (2005) Long remissions in hairy cell leukemia with purine analogs: a report of 219 patients with a median follow-up of 12.5 years. *Cancer* 104: 2442-2448
- Else M, Osuji N, Forconi F, Dearden C, Giudice ID, Matutes E, Wotherspoon A, Lauria F, Catovsky D (2007) The role of rituximab in combination with pentostatin or cladribine for the treatment of recurrent/refractory hairy cell leukemia. *American Cancer Society* 110: 2240-2247
- Emanuel EJ, Brampton AD, Burton DR, Dwek RA (1982) Formation of complement subcomponent C1q-immunoglobulin G complex. *Biochemical Journal* 203: 361-372
- Estey EM, Kurzrock R, Kantarjian HM, O'Brien SM, McCredie KB, Beran M, Koller C, Keating MJ, Hirsch-Ginsberg C, Huh Yo, Stass S, Freireich E.J. (1992). Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Blood* 79: 882

Ewald O (1923) Die leukämische reticuloendotheliose. Deutsches Archiv für klinische Medizin 142: 222

Fay JW, Moore JO, Logue GL, Huang AT (1979) Leukopheresis therapy of leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia) Blood, 54: 747-749

Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK, Head D, Benett JM, Hutchinson R, Corbett W, Cassileth P, Habermann T, Golomb H, Rai K, Eisenhauer E, Appelbaum F, Cheson B, Grever MR (2000) Longterm follow-up of remission duration, mortality, and second malignancies in hairy cell leukemia patients treated with pentostatin. Blood 96: 2981-2986

Foon KA, Nakano GM, Koller CA, Longo CL and Steis RG (1986) Response to 2'-deoxycoformycin after failure of interferon- α in nonsplenectomized patients with hairy cell leukemia. Blood 68: 297-300

Foon KA, Maluish AE, Abrams PG, Wrightington S, Stevenson HC, Alarif A, Fer MF, Overton WR, Poole M, Schnipper EF, Jaffe ES, Herberman RB (1986) Recombinant leukocyte A interferon therapy for advanced hairy cell leukemia. American Journal of Medicine 80: 351

Froni L, Catovsky D, Luzzatto L (1987) Immunoglobulin gene rearrangements in hairy cell leukemia and other chronic B cell lymphoproliferative disorders. Leukemia 1: 389-92

Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ (1978) Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. Lancet 2: 1067

Golomb HM, Catovsky D, Golde DW (Hairy cell leukemia: A clinical review based on 71 cases. Annals of Internal Medicine 89: 677

Goodman GR, Burian C, Koziol JA, Saven A (2003) Extended follow-up of patients with Hairy cell leukemia after treatment with Cladribine. Clinical Oncology 21: 891-896

Gramatovici M, Bennett JM, Hiscock JG, Grewal KS (1993) Three cases of familial hairy cell leukemia. American Journal of Hematology 42: 337-339

Grever MR, Siaw MF, Jacob WF, Neidhart JA, Miser JS, Coleman MS, Hutton JJ, Balcerzak SP (1981) The biochemical and clinical consequences of 2'-deoxycoformycin in refractory lymphoproliferative malignancy. Blood 57: 406

Grever M, Kopecky K, Foucar MK, Head D, Benett JM, Hutchinson RE, Corbett WE, Cassileth PA, Habermann T, Golomb H (1995) Randomized comparison of pentostatin versus interferon alpha-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. Journal of Clinical Oncology 13: 974-982

Griffig J, Koob R, Blakley RL (1989) Mechanism of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. Cancer Research 49: 6923-6928

Hagberg H, Lundholm L. (2001) Rituximab, a chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody in the treatment of hairy cell leukaemia. British Journal of Haematology 115: 609-611.

Handin RI, Lux SE, Stossel TP (2003) Biology and classification of lymphoid neoplasms. *Blood: principles and practice of hematology*. Nancy Lee Harris and Judith A. Ferry Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 755.

Hardel JL, Eriksson M (2002): Exposure to pesticides as risk factor for Non-Hodgkin's lymphoma and hairy cell leukemia: Pooled analysis of two Swedish case control studies. *Leukemia Lymphoma* 43: 1043-1049

Hensel M, Ho AD (2003) Successful treatment of a patient with Hairy cell leukemia and pentostatin-induced autoimmune thrombocytopenia with rituximab. *American Journal of Hematology* 73: 37-40

Hershfield MS, Kredich NM, Ownby DR, Ownby H, Buckley R (1979) In vivo inactivation of S-adenosyl homocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in adenosine deaminase-deficient patients. *The Journal of Clinical Investigation* 63: 807

Hounieu H, Shashikant M, Chittal FR, Saati TA, Mascarel AD, Sabattini E, Pileri S, Falini B, Ralfkiaer E, LeTouneau A, Selves J, Voigt JJ, Laurent G, Diebold J, Delsol G (1992) Hairy cell leukemia. Diagnosis of bone marrow involvement in paraffin-embedded sections with monoclonal antibody DBA.44. *American Journal of Clinical Pathology* 98:26

Huang MC, Hatfield K, Roetker AW, Montgomery IA, Blakley RL (1981) Analogs of 2'-deoxyadenosine: Facile enzymatic preparation and growth inhibitory effects on human cell lines. *Biochemical Pharmacology*. 30: 2663

Huang P, Chubb S, Plunkett W (1990) Termination of DNA Synthesis by 9-β-D-Arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 16617-16625

Chandra J, Mansson E, Gogvadze V, Kaufmann SH, Albertioni F, Orrenius S (2002) Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to a lack of calcium-dependent cytochrome c release. *Blood* 99: 655-663

Cheson B, Vena D, Foss F, Sorensen J (1994) Neurotoxicity of purine analogs: a review. *Journal of Clinical Oncology* 12:2216-2228

Chrobák L (1999) *Leukémie s Vlasatými buňkami*. Galén, Praha

Chubar I, Benett M (2003) Cutaneous reactions in hairy cell leukaemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine and allopurinol. *British Journal of Haematology* 122: 768-770

Janckila AJ, Wallace JH, Yam LT (1982) Generalized monocyte deficiency in leukaemic reticuloendotheliosis. *Scandinavian journal of haematology* 29:153-160

Jansen J, LeBien TW, Kersey JH (1982) The phenotype of the neoplastic cells of hairy cell leukemia studied with monoclonal antibodies. *Blood* 59: 609-614

Jehn U, Bartl R, Dietzfelbinger H, Vehling-Kaiser U, Wolf-Hornung B, Hill W, Heinemann V (1999) Long-term outcome of hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *Annals of Hematology* 78: 139-144

Johnstone AP, Williams GT (1982) Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. *Nature* 300: 368-370

Juliusson G, Liliemark J (1999) 2-Chlorodeoxyadenosine (CdA) in lymphoproliferative diseases. Clinical and pharmacokinetic studies. *Blood* 76: 354a

Juliusson G, Lenkei R, Liliemark J (1994). Flow cytometry of blood and bone marrow cells from patients with hairy cell leukemia: phenotype of hairy cells and lymphocyte subsets after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 83: 3672–3681

Juliusson G, Liliemark J (1992) Rapid recovery from cytopenia in hairy cell leukemia after treatment with 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA): relation to opportunistic infections. *Blood* 79: 888–94

Kawasaki H, Carrera CJ, Piro LD, Saven A, Kipps TJ, Carson DA (1993) Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5' nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 81: 597-601

Kazimierczuk Z, Cottam HB, Revankar GR, Robins RK (1984) Synthesis of 2'-deoxytubercidin, 2'-deoxyadenosine, and related 2'-deoxynucleosides via a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure. *Journal of the American Chemical Society* 106: 379–6382

Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, J. Redman J, C. Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ, McCredie KB Fludarabine: A new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 74: 19-25

Klener P (2002) *Klinická onkologie*. Galén, Praha Karolinum

Knudsen TB, SK Otey, JK Church, MR Blackburn, RS Winters, MJ Airhart, Skalko RG (1990) Adenosine accumulation in the gestation site following maternal treatment with deoxycoformycin. *Toxicologist*, 10: 38

Konwalinka G, Schirmer M, Hilbe W, Fend F, Geisen F, Knoblochner A, Petzer A, Thaler J (1995) Minimal Residual Disease in Hairy-cell Leukemia after Treatment with 2-Chlorodeoxyadenosine *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 31: 142-151

Kraut EH, Bouroncle BA, Grever MR (1986) Low-dose deoxycoformycin in the treatment of hairy cell leukemia. *Blood*. 68: 1119-1122

Kraut EH, Grever MR, Bouroncle BA (1994) Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with 2'-deoxycoformycin. *Blood* 84: 4061-4063

Kredich NM, Hershfield MS (1979) 5-Adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *The Proceedings of the National Academy of Science USA* 76: 2450

Kreitman RJ, Wilson WH, Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I (1999) Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin *Blood* 94: 3340-3348

- Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy cell leukemia. *The New England Journal of Medicine* 345: 241-247
- Kurzrock R, Strom SS, Estey E, O'Brien S, Keating MJ, Jiang H, Adam T, Talpaz M (1997) Second cancer risk in hairy cell leukemia. Analysis of 350 patients. *Journal of Clinical Oncology* 15: 1803-10
- Lauria F, Bocchia M, Marotta G, Raspadori D, Zinzani PL, Rondelli D (1999) Weekly administration of 2-chlorodeoxyadenosine in patients with hairy-cell leukemia is effective and reduces infectious complications. *Haematologica* 84: 22-25
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157
- Luebke RW, Lawson LD, Rogers RR, Riddle MM, Smialowicz RJ (1987) Immune function in mice exposed to the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin during immune system development. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 9: 149-161
- Magee MJ, McKenzie S, Filippa DA, Arlin ZA, Gee TS, Clarkson BD (1985) Durability of response to splenectomy in 26 patients and treatment of relapse with androgens in six patients. *Cancer* 56: 2557-2562
- Machii T and Kitani T (1984) Similarities between IgG-bearing lymphocytes and hairy cells: cytologic and cytochemical studies. *Blood* 64: 166-172
- Major PP, Agarwal RP, Kufe DW (1981) Clinical pharmacology of deoxycoformycin. *Blood* 58: 91-96
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M (2003) Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101: 2328-2334
- Montgomery JA, Hewson K (1969) Nucleosides of 2-fluoroadenine. *Journal of Medical Chemistry* 12: 498-504
- Mover S, Li CY, Yam LT (1972) Semiquantitative evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase activity in human blood cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 80: 711-717
- Mulligan SP, Travade P, Matutes E, Dearden C, Visser L, Poppema S, Catovsky D (1990) B-ly-7, a monoclonal antibody reactive with hairy cell leukemia, also defines an activation antigen on normal CD8⁺ T cells. *Blood* 76: 959-964
- Murphy SB, Herrod HG, Sinkule JA, Abromowitch M, Rivera G (1984) Severe combined immunodeficiency and profound weight loss associated with chronic intermittent administration of 2'-deoxycoformycin. *Cancer Treatment Symptoms* 2: 63

- Nordström M, Hardell L, Magnuson A, Hagberg H, Rask-Andersen A (1998) Occupational exposures, animal exposure and smoking as risk factors for hairy cell leukaemia evaluated in a case-control study. *British Journal of Cancer* 77: 2048-2052
- Parker WB, Ashok RB, Shen SX, Townsend AJ, Cheng XC (1988) Interaction of the 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerase, DNA primase and ribonucleotide reductase. *Molecular Pharmacology* 34: 485-491
- Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J (2004) Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 18: 385-393
- Pfeffer ML, Dinarello CA, Herberman RB, William BRG, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S (1998) Biological properties of recombinant- α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research* 58: 2486–2499
- Piro LD, Carrera CJ, Beutler E, Carson DA (1988) 2-Chlorodeoxyadenosine An effective new agent for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 72: 1069-1073
- Piro LD, Saven A, Ellison D, Thurston D, Carson DA, Beutler E (1992) Prolonged complete remissions following 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA) in hairy cell leukemia (HCL). *American Society of Clinical Oncology* 1 :846
- Plunkett W, Gandhi V (1993) Cellular metabolism of nucleoside analogs in CLL: implications for drug development. *Scientific Advances and Clinical Developments*. New York: Marcel Dekker, Inc., 197-219
- Psiachou-Leonard E, Bain BJ (1998): Persistent bone marrow failure with dysplastic features following pentostatin therapy for hairy cell leukaemia. *Clinical and Laboratory Haematology* 20: 195–197
- Rai KR, Davey F, Peterson B, Schiffer C, Silver RT, Ozer H, Golomb H, Bloomfield CD (1995) Recombinant α -2b interferon in therapy of previously untreated hairy cell leukemia long-term follow-up results of study by Cancer and Leukemia Group B. *Leukemia* 9: 1116-1120
- Raida L, Indrák K, Žák P (2008): Leukemie s vlasatými buňkami. *Onkologie* 3: 163–166
- Raimbourg J, Cormier G, Varin S, Tanguy G, Bleher Y, Maisonneuve H (2009) Hairy-cell leukemia with inaugural joint manifestations. *Joint Bone Spine* 76: 416-420
- Reff ME, Carner C, Chambers KS, Chinn PS, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445
- Ribeiro P, Bouaffia F, Peaud PY, Blanc M, Salles B, Salles G, Coiffier B (1999) Long term outcome of patients with hairy cell leukemia treated with pentostatin. *Cancer* 85: 65–71
- Robak T, Blasińska-Morawiec M, Blohski J, Hellmann A, Halaburda K, Konopka L, Kotlarek-Haus S, Potoczek S, Hansz J, Dmoszyńska A, Urasiriski I, Zdziarska B, Dwilewicz-Trojaczek J, Holowiecki J, Skotnicki AB (1999) 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) in the

treatment of hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant: 7-year experience in Poland. *European Journal of Hematology* 62: 49-56

Robak T, Kasznicki M, Góra-Tybor J (2004). Randomized comparison of weekly administration and daily courses of cladribine in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 104: 948a

Robak T, Korycka A, Lech-Maranda E, Robak P (2009) Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules* 14: 1183-1226

Robertson LE, Chubb S, Meyn RE, Story M, Ford R, Hittelman WN, Plunkett W (1993) Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 81: 143-150

Rodriquez, CO, Mitchell BS, Ayres M, Eriksson S, Gandhi V (2002) Arabinosylguanine is phosphorylated by both cytoplasmic deoxycytidine kinase and mitochondrial deoxyguanosine kinase. *Cancer Research* 62: 3100-3105

Rohr A, Schmitz SFH, Tichelli A, Hess U, Piguet D, Wernli M, Frickhofen N, Konwalinka G, Zulian G, Ghielmini M, Rufener B, Racine C, Fey MF, Cerny T, Betticher D, Tobler A (2002) Treatment of hairy cell leukemia with cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) by subcutaneous bolus injection: a phase II study. *Annals of Oncology* 13: 1641-1649

Santana VM, Mirro JJr., Harwood FC, Cherrie J, Schell M, Kalwinsky D, Blaldehy RL (1991) A phase I clinical trial of 2-chlorodeoxyadenosine in pediatric patients with acute leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 9: 416-422

Saven A, Burian C, Koziol JA, Piro LD (1998) Long-term follow-up of patients with Hairy cell leukemia after Cladribine treatment. *Blood* 92: 1918-1926

Saven A, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E, Piro LD (1992) 2-Chlorodeoxyadenosine: An active agent in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 80: 587-592

Saven A, Piro LD (1993) Complete remissions in hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine after failure with 28-deoxycoformycin. *Annals of Internal Medicine* 119: 278

Saxon A, Stevens RH, Golde DW (1978) T-lymphocyte variant of hairy-cell leukemia. *Annals of Internal Medicine* 88: 323-326

Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA (1985) Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 75: 377-83

Sigal DS, Miller HJ, Schram ED, Saven A (2010) Beyond hairy cell: the activity of cladribine in other hematologic malignancies. *Blood* 116: 2884-2896

Smalley RV, Anderson SA, Tuttle RL, Connors J, Thurmond LM, Huang A, Castle K, Magers C, Whisnant JK (1991) A randomized comparison of two doses of human

lymphoblastoid interferon- alpha in hairy cell leukemia. Wellcome HCL Study Group Blood 78: 3133-3141

Smyth JF, Young RC, Young DM (1978) In vivo toxicity to lymphoid tissue by 2'-deoxycoformycin. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 1 : 49

Smyth JF, Chassin MM, Harrap KR et al. 2-Deoxycoformycin (DCF): phase I trial and clinical pharmacology (1979) Proceedings of the American Association of Cancer Research 20: 47

Smyth JF, Paine RM, Jackman AL, Harrap KR, Chassin MM, Adamson RH, Johns DG (1980) The Clinical Pharmacology of the Adenosine Deaminase Inhibitor 2'-Deoxycoformycin. Cancer chemotherapy and pharmacology 5: 93-101

Crary SH, Buchanan GR (2009) Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. Blood 114: 2861-2868

Tallman MS, Hakimian D, Variakojis D, Koslow D, Sisney GA, Rademaker AW, Rose E, Kaul KA (1992) Single cycle of 2-chlorodeoxyadenosine results in complete remission in the majority of patients with hairy cell leukemia. Blood 80: 2203-2209

Tallman MS, Hakimian D, Kopecky KJ, Wheaton S, Wollins E , Foucar K, Cassileth PA, Habermann T, Grever M, Rowe JM, Peterson LC (1999) Minimal residual disease in patients with hairy cell leukemia in complete remission treated with 2-chlorodeoxyadenosine or 2-deoxycoformycin and prediction of early relapse. Clinical Cancer Research 5: 1665–1670

Thomas DA, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Faderl S, Keating MJ, Giles FJ, Cortes J, Kantarjian HM (2003) Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. Blood 102: 3906-3911

Tortorella C, Rovaris M, Filippi M (2001) Cladribine (Ortho Biotech Inc.). Current Opinion in Investigational Drugs 2 :1751-1756

Tsimberidou AM, Giles F, Duvic M, Fayad L, Kurzrock R (2004) Phase II study of pentostatin in advanced T-cell lymphoid malignancies: update of an M.D. Anderson Cancer Center series. Cancer 100: 342-349

Urba WJ, Baseler MW, Koop WC, Steis RG, Clark JW, Smith JW, Coggin DL, Longo DL (1989) Deoxycoformycin-induced immunosuppression in patients with hairy cell leukemia. Blood 73: 38–46

Venner PM, Glazer RI (1979) The metabolism of 2'-deoxycoformycin by L1210 cells in vitro. Biochemical Pharmacology 28: 3239

Lydia Visser, Andy Shaw, Joseph Slupsky, Hans Vos, and Sibrand Poppema (1989) Monoclonal antibodies reactive with hairy cell leukemia, Blood. 74: 320-325

Wheaton S, Tallman MS, Hakimian D, Peterson LA (1996) Minimal residual disease may predict bone marrow relapse in patients with hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. Blood 87: 1556–1560

