

AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE KOSTNÍ DŘENĚ U NEMOCNÝCH S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ

AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF BONE MARROW IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

HÁJEK R., KRAHULCOVÁ E., PENKA M., MAYER J.

II. INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

Souhrn: Chronická myeloidní leukémie (CML) je zhoubným nádorovým onemocněním, které dříve nebo později progreduje z relativně benigní chronické fáze do velmi agresivní terminální blastické fáze onemocnění. Interferon alfa (INF), jako nejúčinnější lék ze standardně používaných léků první řady, dokáže výrazně prodloužit období chronické fáze. Jediným léčebným postupem s možností kompletního vyléčení nemocných s CML je použití alogenní transplantace kostní dřeně (alo-TKD). Bohužel se pro většinu nemocných nenaleznou vhodný dárcé nebo je vylučovacím kritériem věk nebo jiné onemocnění. Autologní TKD (auto-TKD) je v současnosti zkoušenou léčebnou strategií u nemocných s CML. První generace klinických studií prokázala proveditelnost auto-TKD u nemocných s CML. Podle první analýzy studií jsou výsledky auto-TKD oproti standardní léčbě lepší. Vzhledem k vysoké kontaminaci autologního štěpu byla odzkoušena řada metod „in vivo“ a „ex vivo“ čištění autologního štěpu. Přestože v druhé polovině 80. let byla zahájena řada klinických studií, přínos auto-TKD není pro léčbu nemocných s CML stanoven. V současnosti probíhá několik randomizovaných klinických studií srovnávajících alo-TKD, auto-TKD a standardní léčbu. Nepřítomnost reakce štěpu proti leukémii je pravděpodobně důvodem četnějších relapsů po auto-TKD. Stimulace autologního efektu reakce štěpu proti nádoru a kombinace auto-TKD s intenzivní imunoterapií patří mezi perspektivní léčebné možnosti s cílem zlepšit výsledky auto-TKD.

Klíčová slova: CML, autologní transplantace, imunoterapie

Summary: Chronic myelogenous leukemia (CML) is a lethal hematopoietic malignancy, which progresses from a chronic phase to a fatal blast crisis. Although interferon- α (INF), the best agent from the first-line conventional therapy, can prolong the chronic phase, this therapy is not curative. Allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) is the only option with curative potential at present. Unfortunately, allo-BMT has its limitations and more than half of patients may not be eligible for allo-BMT. Autologous BMT (auto-BMT), which is tested as a treatment option for patients with CML, is reviewed in this article. The first generation of clinical trials has shown that auto-BMT is a feasible strategy with encouraging results in the first multicentric analysis. A number of „in vivo“ and „ex vivo“ purging techniques were evaluated to reduce high tumor contamination of autologous graft in CML patients. Despite the fact that during the last few years an increasing number of patients suffering from CML have undergone autologous BMT in the world, the exact role of autologous BMT in CML has not yet been established. This question has to be addressed by undergoing the prospective randomized trials which would compare allo-BMT, auto-BMT and standard treatment in patients with CML. Lack of graft-versus-tumor effect is one of the possible factors responsible for the higher relapse rate seen after auto-BMT than after allo-BMT. Thus, induction of GVL effect in the autologous setting and combination of auto-BMT with intensive immunotherapy is a promising approach.

Key words: CML, autologous BMT, immunotherapy

Úvod

Chronická myeloidní leukémie (CML) je poruchou hematopoetických kmenových buněk, která dříve nebo později progreduje z relativně benigní chronické fáze do velmi agresivní terminální blastické fáze onemocnění.

Chromosomální translokace t(9;22), označovaná jako pozitivita Philadelphského chromozomu (Ph⁺), vede ke tvorbě chimerického genu BCR-ABL a následné syntéze proteinů s tyrosin-kinázovou aktivitou. Tato genetická aberace se vyskytuje téměř u všech nemocných s CML. Je dobře zachytitelná pomocí cytogenetického vyšetření, FISH metody (Fluorescent in situ hybridisation), „Southern blot analysis“ DNA. Možnost kvalitativního a hlavně kvantitativního hodnocení dynamiky choroby a léčebné odpovědi vyšetřením BCR-ABL pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR = polymerase chain reaction) je významným pokrokem. Vyšetření má průkaznou výpočetní hodnotu pro předpověď cytogenetického a hematologického relapsu po alogenní transplantaci kostní dřeně (1). CML se stala modelovým onemocněním pro hodnocení a monitoraci různých léčebných přístupů v klinické praxi. V léčbě nemocných s CML se používá busulfan, hydroxyurea, interferon alfa (INF), interferon v kombinaci s nízkými dáv-

kami ara-C, alogenní transplantace kostní dřeně (alo-TKD), převod T-lymfocytů od dárcé alogenního štěpu při relapsu onemocnění. Řada dalších léčebných postupů se intenzivně zkoumá, včetně využití autologní transplantace kostní dřeně (auto-TKD) a modulace reakce štěpu proti leukémii (GVL – „graft versus leukemia efekt“).

Interferon alfa (INF) jako jediný z léků používaných v úvodu léčby dokáže ve vyšším procentu (kolem 10 %) dosáhnout kompletní cytogenetické remise u CML. Nemocní zůstávají přes Ph1 negativitu téměř ve 100 % BCR-ABL pozitivní a pravděpodobnost vyléčení je minimální (2).

Jediným léčebným postupem s možností kompletního vyléčení nemocných s CML je použití alogenní TKD nebo převod alogenních periferních kmenových buněk (PKB) [v textu bude pro oba způsoby použito zkratky alo-TKD] (3). Alo-TKD je proto považována za standardní postup a pokus o vyhledání dárcé by měl být proveden u všech indikovaných nemocných. Využití této léčebné metody je limitováno několika faktory (přibližně u 75 % nemocných není nalezen vhodný dárcé nebo je alogenní transplantace kontraindikovaná z jiných důvodů; vlastní provedení alo-TKD je rizikovou procedurou s vyšší mortalitou ve skupině nepříbuzenských dárců) (4, 5). Obecně

je jednoznačně lepších výsledků dosahováno tehdy, je-li alo-TKD provedena časně v chronické fázi onemocnění, u mladších nemocných a u nemocných předléčených hydroxyureou [oproti busulfanu] (4, 6).

Alo-TKD by měla být vždy zvažovanou léčebnou strategií u nově zjištěných nemocných s CML do 55 let. V takovém případě by měl být vyloučen busulfan ze zahajovací léčby. U mladých nemocných s plně shodným sourozencem v HLA systému je transplantace jasně indikována. U starších věkových skupin nebo v případě problematického dárce (neshoda v 1 antigenu HLA) je první léčebnou variantou použití INF. Pokud nemocný nereaguje po prvních 6-12 měsících na léčbu je provedení alo-TKD indikované, protože přes všechna rizika může zásadním způsobem zvratit prognosticky nepříznivý stav nemoci. Použití nepřítbuzenského dárce vyhledaného v registru je vyhrazeno jen mladším jedincům zpravidla do 45 let.

Zkouší se řada experimentálních léčebných postupů. Nejperspektivnější se zdají metody modulující reakci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease - GVHD) po alogenní transplantaci, která má zásadní podíl na vysoké úmrtnosti související s využitím alo-TKD. Reakce GVHD je spojena s reakcí štěpu proti leukémii (graft versus leukemia - GVL). Existuje dostatečné množství vědeckých podkladů pro tvrzení, že CML je nádorovým onemocněním, kde má reakce GVL klíčovou roli v léčbě onemocnění (7). Pravděpodobně má reakce GVL na léčbě odpovědi větší podíl než vysokodávkovaná chemoterapie podaná v rámci transplantace režimu. Modulační GVHD v optimálním případě znamená potlačení reakce GVHD a udržení efektu GVL. Zdá se, že nejnovější imunologické a imunogenetické manipulace se štěpem nebo přesněji s T-lymfocyty takovou modulaci umožní (8).

Perspektivní mohou být i metody využívající genové technologie k přípravě specifických oligodeoxynukleotidů („antisense oligodeoxynucleotide“) použitelných k cílenému zablokování genu majícího v patofyziologii CML zásadní význam (9). Jejich experimentální klinické zkoušení probíhá.

Z novějších postupů se v klinické praxi výrazněji uplatňují autologní TKD nebo převod PBK (dále v textu jen auto-TKD). Postavení auto-TKD je věnováno toto sdělení shrnující současné výsledky a problematiku auto-TKD i nové postupy manipulace s autologním štěpem.

Současné výsledky autologních transplantací u nemocných s CML

Goldman a spol. v 70. letech ověřili možnost získání autologního štěpu ještě před zahájením léčby ve fázi hyperleukocytózy. Lze říci, že tímto byl zahájen vývoj léčebné strategie začleňující auto-TKD mezi zvažované léčebné postupy u nemocných s CML (10). Körbling a spol. provedli první auto-TKD v roce 1978 u nemocných s CML (11). Přestože v druhé polovině 80-tých let byla zahájena řada klinických studií používající auto-TKD v léčbě CML, není přínos auto-TKD pro nemocné s CML jasný. Do této doby nebyly prezentovány výsledky žádné randomizované studie srovnávající auto-TKD a standardní léčebný postup nebo auto-TKD a alo-TKD. Studie CML IV organizovaná pracovní skupinou CML Medical Research Council (MRC) ve Velké Británii ve spolupráci s Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) v USA srovnává všechny tři léčebné strategie v léčbě CML. Byla zahájena v roce 1995 a první výsledky lze očekávat nejdříve za 5-7 let od jejího zahájení (protokol CML IV MRC). Multicentrická randomizovaná studie CML-Studie IIIA byla v roce 1997 zahájena v Německu. Výsledky doposud publikovaných nerandomizovaných studií naznačují, že časné zařazení auto-TKD bude pravděpodobně přínosem (2, 12-16). V roce 1994 prezentoval Mc Glave první větší analýzu výsledků auto-TKD u více než 200 nemocných z 8 onkologických center. Tak jako při použití alogenního štěpu, bylo dlouhodobé přežití závislé na stádiu onemocnění, ve kterém byla auto-TKD provedena (17). Retrospektivní výsledky stan-

dardní léčby byly horší. V roce 1997 byla data této analýzy aktualizována: přežití ve skupině nemocných v CP je oproti nemocným ve fázi akcelerace nebo blastickém zvratu signifikantně lepší s pravděpodobností 66 % přežití po 4 letech a mortalitou kolem 10 % v prvním roce po provedení auto-TKD. Nižší věk ($p = 0,04$) a kratší interval od stanovení diagnózy do provedení transplantace ($p = 0,08$) byly nezávislé faktory signifikantně zlepšující výsledky léčby. Většina přežívajících nemocných má již známky relapsu onemocnění (18). Zdá se tedy, že přínos autologní transplantace oproti standardní léčbě může být pravděpodobně prokázán. Proloužení života bude způsobeno především snížením nádorové masy vysokodávkovanou léčbou a následným zpomalením přirozeného vývoje onemocnění. Ke kompletní eliminaci nádorových buněk, kterou je v některých případech vidět po alo-TKD, pravděpodobně nedojde. Hodnocení léčebného potenciálu této metody by bylo předčasné. Vyše uvedená analýza zahrnuje rozličné léčebné postupy včetně manipulace se štěpem. Přínos pro dlouhodobé přežití není zatím prokázán.

Tyto studie byly pilotní a potvrdily, že tato metoda je schůdná pro nemocné s CML a možná bude i léčebnou variantou pro nemocné nemající dárce pro alogenní příbuzenskou TKD. Na druhou stranu testované stimulační režimy nebyly zdaleka optimální, nemocní byli často dlouhodoběji předléčení INF. Tomu odpovídá i vyšší mortalita u některých stimulačních režimů (kolem 5 %) i vlastní peritransplantační mortalita i u nemocných v první CP (až 15-20%) a rovněž nekvalitní přihojení zvláště u nemocných, kde bylo použito manipulace se štěpem.

Získání autologního štěpu

Dvě zjištění ovlivnila vývoj taktiky sběru autologního štěpu u nemocných s CML: [1] masivní kontaminace autologního štěpu nádorovými buňkami u nemocných s CML; [2] zjištění, že buňky obsažené ve štěpu se mohou podílet na relapsu onemocnění (19). Výzkumné skupiny proto velmi brzy zaměřily své úsilí na získání „čistého“ autologního štěpu (Ph¹ negativní, BCR-ABL neg.). Používá se různých metod „ex vivo“ čištění, metod dlouhodobých, optimální načasování sběru autologního štěpu a zařazení intenzivních chemoterapeutických režimů s cílem minimalizovat množství Ph¹+ buněk při sběru štěpu. Při vývoji nelze opominout i všeobecný přechod od sběru štěpu z kostní dřeně ke sběru PKB z periferní krve po stimulační terapii. Řada experimentálních postupů je ve vývoji. Nejprve byly používány vysoce kontaminované štěpy získané u nově diagnostikovaných nemocných před zahájením léčby standardní metodou aspirace kostní dřeně z lopaty kosti kyčelní. Autologní štěpy nebyly dále upravovány, měly vysoký obsah CFU-GM a přihojení štěpu bylo velmi rychlé (20). Většina nemocných byla po převodu štěpu Ph¹ pozitivní, ale stojí za povšimnutí, že malá část nemocných zůstala po provedení auto-TKD Ph¹ negativní po dobu několika let (21-24). Novější postupy s cílem získat „čistý“ štěp neobsahující Ph¹+ progenitory pomocí tzv. „in vivo“ čištění štěpu pomocí chemoterapie se začaly uplatňovat na konci 80. let. Přehled používaných stimulačních režimů je v tabulce 1. Po krátkodobé vstupní léčbě (hydroxyurea nebo INF) byly použity stimulační vysokodávkované chemoterapeutické postupy. Velmi dobrých výsledků dosáhli Carella a spol., kteří získali u vysokého počtu nemocných čistý štěp, získaný časné (sběr zahájen při vzestupu leukocytů $> 0,8 \times 10^9/l$ a CD34+ nad hranici detekovatelnosti 0,05 % z mononukleárních buněk) po vysokodávkované chemoterapii idarubicin, ara-C a etoposide (ICE) a růstovým faktoru (5 $\mu g/kg$ G-CSF). Lepších výsledků bylo dosaženo ve skupině nemocných v chronické fázi onemocnění, z nichž u nemocných nepředléčených INF s provedeným sběrem PKB do 1 roku od stanovení diagnózy bylo 64 % štěpů Ph¹ negativních. V blastické fázi bylo Ph¹ negativních 21 % štěpů, ve fázi akcelerace 17 %. Rovněž rozdíly v toleranci režimu ICE nemocnými s CML byly závislé na stavu onemocnění. Poměry pro nehematologickou toxicitu III. a IV. stupně

Tabulka 1: Používané režimy před sběrem periferních kmenových buněk u nemocných s CML.

AUTORI	REŽIM
Carrela a spol. (12)	ICE nebo mini ICE, G-CSF
Chalmers a spol. (13)	IC (E), G-CSF
Hazel a spol. (64)	IC, G-CSF
Hughes a spol. (31)	Cyklofosamid, G-CSF
Johnson a spol. (25)	Hydroxyurea (vysokodávkovaná) + G-CSF
Kantarjian a spol. (29)	FAM, danno-HDAC
Mehta a spol. (27)	Hydroxyurea (vysokodávkovaná)
Reiffers a spol. (33)	G-CSF (samostatně)
Tringali a spol. (28)	Cyklofosamid

byly pro skupiny v blastické fázi, fázi akcelerace a chronické fázi následující: 63 %, 35 %, 11-28%. Úmrtnost při ICE režimu byla: 13 %, 7 %, 0-4 % (12).

Byly zkoušeny i další stimulační režimy (Cyklofosamid v dávce 5-7 g/m², vysokodávkovaná hydroxyurea - 6g 2x denně po 7 dnů nebo 3,5 g/m² po dobu 7 dnů s následným podáním 5 mg G-CSF/kg, kombinace daunorubicinu, Ara-C nebo kombinace Ara-C, fludarabinu a mitoxantronu, kombinace cyklofosfamidu s busulfanem, kombinace idarubicinu s Ara-C a mel-falanem 140mg/m²), jejichž výsledky jsou z hlediska čistoty štěpu zpravidla horší než při použití režimu ICE (11, 25-28). Kontaminace periferní krve leukemickými buňkami je menší než kontaminace kostní dřeně (29). Talpaz a spol. našli korelaci mezi mírou kontaminace autologního štěpu Ph¹⁺ buňkami a kontaminací dřeně po provedení auto-TKD (30, 31). Ve snaze zvýšit toleranci stimulačního režimu stejná skupina lékařů hodnotící režim ICE srovnala tento stimulační režim s chemoterapií mini-ICE, ve kterém je podání cytostatik jen 3 dny (ICE - 5 dnů). Stručně lze shrnout, že tolerance nového režimu byla výborná. Ve chronické fázi CML do 1 roku od zahájení léčby onemocnění nebylo u 14 nemocných zaznamenáno úmrtí ani vážná nehematologická toxicita. Čistý štěp (Ph¹ neg.) byl získán u 60% nemocných nepředléčených INF, u 40% nemocných předléčených INF do 1 roku, podobně jako u režimu ICE (32). Reiffers a spol. úspěšně použili samostatného G-CSF pro sběr dostatečného štěpu u nemocných reagujících na INF (33). Použití režimu mini-ICE nebo ICE by mělo být upřednostněno u nemocných v pozdní chronické fázi onemocnění nebo fázi akcelerace onemocnění, kdy dosahují statisticky signifikantně lepší léčebné odpovědi (69% versus 13% velkých léčebných odpovědí) než režimy obsahující jen Ara-C a antracyklin typu 2+5 nebo 3 + 7 (34). Novější studie již zařazují sběr PKB časně po zjištění diagnózy, což se odráží ve velmi dobré toleranci režimu nemocnými a získání kvalitního štěpu u více než 90 % nemocných s nízkým stupněm kontaminace štěpu nádorovými buňkami (31). Jiným postupem je zařazení intenzivní indukční léčby středně dávkovanou chemoterapií s cílem odebrat štěp po maximálním snížení Ph¹⁺ buněk v kostní dřeni. Z 18 nemocných bylo 50 % nemocných po provedení auto-TKD Ph¹ negativních. Použití INF výrazně neovlivnilo přijetí štěpu, i když nemocní byli léčeni 6 měsíců kombinací INF + HU krátce před odběrem autologního štěpu. (16).

Je pravděpodobně, že Ph¹ negativní progenitorové buňky mají větší proliferativní kapacitu a vyplavují se do periferního oběhu dříve než buňky myeloidní řady Ph¹⁺. Správně zvolená strategie léčby nových nemocných s CML indikovaných k auto-TKD může znamenat efektivní a bezpečné „in vivo“ čištění autologního štěpu. Taková strategie bude zahrnovat optimální kombinaci indukční léčby, stimulačního režimu a správného načasování sběru štěpu. Na základě dosud publikovaných výsledků lze shrnout, že se jednoznačně jeví výhodné sesbírat štěp co nejdříve po stanovení diagnózy. Pro nemocného je postup bezpečnější a pravděpodobnost získání kvalitního štěpu větší. Optimální stimulační režim nebyl definován a lze

dokonce uvažovat o tom, zda je stimulace pomocí chemoterapie potřeba. Nejčastěji používané režimy v probíhajících studiích jsou mini-ICE, idarubicin a Ara-C, vysokodávkovaná hydroxyurea, ale i vysokodávkovaný cyklofosamid, vždy s použitím růstového faktoru. Hledisko bezpečnosti procedury zde má důležitou roli.

„Ex vivo“ čištění štěpu

Cíl manipulací se štěpem „ex vivo“ je stejný jako u „in vivo“ metod čištění: Získání maximálně čistého štěpu při udržení dostatečné kvality štěpu pro časné a kvalitní přijetí transplantátu. Používá se několik rozdílných metod [1] negativní selekce (snížení počtu nádorových buněk ve štěpu) a [2] metod pozitivní selekce (výběr nenádorových PKB ze štěpu).

Z metod používající negativní selekci byla ojedinele použita kultivace s deriváty cyklofosfamidu (35, 36), kultivace s interferonem γ (13), krátkodobá kultivace s IL-2 (37) nebo kultivace PKB rezistentních na 5-fluorouracil s cytokiny (38). Patří sem i metody genové technologie používající c-myc nebo bcr-abl specifické oligodeoxynukleotidy (9, 39).

Neexistuje žádná randomizovaná studie prokazující přínos takového postupu pro zlepšení výsledků. Výše zmíněná analýza výsledků autologních transplantací zahrnujících i 21 upravených štěpů „ex vivo“ neprokázala žádnou jejich výhodu (17). Naopak v řadě případů zřejmě došlo k ovlivnění hematopoetických progenitorových zdravých buněk, na což lze usuzovat z vyšší četnosti selhání přijetí štěpu a výrazně prodloužené doby do přijetí štěpu (14, 18, 40).

Rozvoj metod pozitivní selekce byl limitován skutečností, že zdravé progenitorové kmenové buňky i progenitorové buňky CML jsou CD34 pozitivní. Několik studií prokázalo rozdílnost v expresi antigenu HLA-DR, což umožňuje rozlišení zdravých primitivních kmenových buněk (CD34+, HLA-DR-) a BCR-ABL pozitivních primitivních kmenových buněk (CD34+, HLA-DR+) u nemocných s CML (41). Mezi metody s pozitivní selekcí lze zařadit i využití dlouhodobých kultivací autologního štěpu nemocných s CML, kdy dochází přednostně k přežití Ph negativních progenitorů myeloidní řady, (40, 42). Výčet technik je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Zkoumané možnosti „in vitro“ čištění autologního štěpu od nádorových buněk u nemocných s CML.

KULTIVACE S:
- cytotoxické látky (mafosamid, 4-hydroxyperoxyklofosamid)
- cytokiny (interleukin 2, interferon γ)
- „antisense“ oligonukleotidy
- monoklonální protilátky
POZITIVNÍ SELEKCE hematopoetických progenitorových buněk s imunofenotypem CD34+, DR-
DLOUHODOBÉ KULTIVACE v tkáňových kulturách podle Dexter

Vysokodávkovaná chemoterapie používaná při autologních transplantacích u nemocných s CML

Jde o nejméně zkoumanou oblast v rámci vývoje autologních transplantacích režimů pro nemocné s CML. Alogenní transplantace se u nemocných s CML provádějí poměrně dlouho. Myeloablativní režimy jsou ve vztahu k diagnóze CML kliniky dlouho používané, s poměrně vyváženým vztahem dobré účinnosti a únosné toxicity. Používané přípravné režimy vysokodávkované chemoterapie jsou tedy u auto-TKD podobné nebo stejné jako u alo-TKD (43). Srovnání režimu busulfan-cyklofosamid (Bu-Cy) versus celotělové ozáření-cyklofosamid u alogenních transplantací přineslo velmi podobné výsledky i toleranci (44). Režim Bu-Cy v různých dávkových modifikacích patřil v první generaci protokolů u autologních transplantací asi k nejčastěji používaným režimům. Obecně se dává přednost režimům bez celotělového ozáření. V novějších studiích je dáována přednost méně toxickým režimům (např. mono-

terapie vysokodávkovaným busulfanem 16 mg/kg) s cílem minimalizovat peritransplantační mortalitu, která by vzhledem k charakteru nemoci mohla ohrozit výsledný přínos léčby pro dlouhodobé přežití. Pro nemocné ve fázi akcelerace je toxicita léčby výrazně vyšší. Vhodně zvolený střednědávkovaný režim (busulfan 8 mg/kg) s krátkodobou leukopenií pod $0,5 \times 10^9/l$ a nevýraznou nehematologickou toxicitou má poměrně dobrou účinnost a zdá se být dobrou alternativou pro výrazně předléčené nemocné ve fázi akcelerace onemocnění (45).

Co lze očekávat od klinických protokolů 90. let

Devadesátá léta jsou érou autologních transplantací. Na základě dostupných dat lze předpokládat, že autologní transplantace bude přínosem i pro určitou skupinu nemocných s CML. Tento předpoklad by měly potvrdit probíhající studie. O jakou skupinu nemocných s CML pravděpodobně půjde? Takovou skupinou nemocných by mohli být nemocní v časně chronické fázi onemocnění, u kterých bude zařazení optimálního stimulačního a myeloablativního režimu dobře tolerováno, bude získán kvalitní štěp a jeho příložen bude bezpečné. Vzhledem k tomu, že až 70 % nemocných reaguje velmi dobře na léčbu interferonem, která je bezpečná a zajišťuje zpravidla přežití delší než 5 let, bude mít auto-TKD přednost jen v takovém případě, kdy bude peritransplantační mortalita minimální. Tuto kvalitu transplantace první generace zpravidla nesplňovaly. Takové ambice mají některé nové protokoly 90. let, které zařazují auto-TKD časně u nemocných nedostatečně reagujících na léčbu INF. Používají méně toxické stimulační režimy typu mini-ICE a dobře tolerované myeloablativní režimy s následnou udržovací léčbou INF. Výsledky klinických studií by měly, vedle řady jiných otázek, dát odpověď na 2 základní otázky: [1] je zařazení auto-TKD přínosem pro nemocné nereagující na INF?; [2] je zařazení auto-TKD jako metody první volby přínosem pro nemocné s CML oproti INF? Je rovněž možné, že bude znovu otevřena otázka zatím téměř nezpochybnitelné role alogenní transplantace u nemocných s CML. Současné retrospektivní analýzy porovnávající alogenní transplantaci oproti standardní léčbě (hydroxyurea, INF) prokazují jednoznačný přínos alogenní transplantace pro nemocné až po sedmém roku od provedení transplantace (46). Důvodem je časná, ale i pozdní úmrtnost ve skupině nemocných podstupujících alogenní transplantaci. Nové kombinované režimy, zvláště INF + Ara-C (47) a jiné perspektivní léky (například homoharringtonin ST1571), mohou výrazně zlepšit současné výsledky standardní léčby nemocných s CML. Jejich kombinace s autologní transplantací mohou pro velké skupiny nemocných přinést dlouhodobé přežití při zachování vysoké kvality života, třebaže vyléčitelnost onemocnění zůstane minimální. Na druhou stranu pokroky v alogenním přístupu vedoucí ke snížení mortality (5, 6) a zlepšení kvality života mohou při jasně prokázaném kurativním účinku favorizovat nadále alogenní přístup. Zvláštní výzvou pro výzkumníky je nalezení léčebné strategie, která by dlouhodobě zvrátila akceleraci a blastickou fázi onemocnění zpět do chronické fáze. Současné léčebné strategie dosahují dobrých výsledků jen tehdy, jsou-li uplatněny časně, nejlépe do jednoho roku od vzniku onemocnění.

Tabulka 3: Preklinické výsledky aktivace autologního štěpu kostní dřeně pomocí IL-2 u nemocných s CML.

Medián (n = 5)	Ly+Mo/kg (x 10 ⁸)	CD34+/kg (x 10 ⁶)	CFU-GM/kg (x 10 ⁴)	Vitalita buněk
Den 0 (rozptyl)	0,24 (0,18 - 0,42)	1,57 (0,66 - 8,91)	3,12 (0,37 - 54,27)	83 % (80 - 95)
Den 1 (rozptyl)	0,24 (0,10 - 0,27)	1,29 (0,23 - 2,441)	1,60 (0,15 - 12,37)	96 % (95 - 98)
Návratnost	103,9 %	82,5 %	51,3 %	-

p = p < 0,05, Ly = lymfocyty, Mo = monocyt

Role imunoterapie

Vzhledem k současným znalostem o výrazné léčebné síle alogenního efektu GVL u nemocných s CML nelze předpokládat, že by mohla mít auto-TKD podobně kurativní účinek jako alog-TKD. Je téměř jisté, že vysokodávkovaná chemoterapie není schopna kompletně eradikovat nádorové hematopoetické kmenové buňky. Auto-TKD však může vytvořit dobrou startovací pozici pro zesílení léčebného efektu imunoterapie tím, že uvádí chorobu do stavu minimální zbytkové choroby. Tato situace se dnes obecně považuje za stav, při kterém může mít nemocný podstupující autologní transplantaci největší užitek z imunoterapie vzhledem k limitované schopnosti imunitního systému eradikovat nádor. Nepřímým důkazem je pozorování obnovy citlivosti CML na INF po provedení auto-TKD a zpravidla nutné použití nižší dávky INF po auto-TKD než při zahájení léčby (18). Alogenní efekt GVL má dnes v léčbě relabujících nemocných s CML po alogenní transplantaci významné místo. Problematika GVHD a GVL je velmi složitá a není cílem tohoto sdělení. Zájemce odkazujeme na souhrnné práce citované v literatuře (7, 48). Zde stručně uvádíme současný stav této problematiky v rámci experimentálního autologního přístupu, při kterém se výzkumníci snaží vyvolat autologní GVL s využitím imunokompetentních buněk štěpu nebo organismu.

Stimulace autologní GVHD, respektive autologního GVL, je dnes ověřeno skutečností na zvířecích modelech i v klinických studiích. Autologní efekt GVHD jde vyvolat cyklosporinem (49), IL-2 (50), aktivací LAK buněk pomocí IL-2 (51), převodem autologního štěpu kultivovaného s cytokiny (52). Klinické studie probíhají. Přínos takového postupu není zatím v klinické praxi jasně prokázán. Je prokázána cytotoxická aktivita aktivovaných NK buněk u CML. Nejvyšší u buněk nesoucí povrchové znaky CD3-CD56+ (53). Důležitým zjištěním je fakt, že buňky nesoucí znak CD56+ jsou BCR-ABL negativní (53). O specifických T lymfocytech schopných cíleně ničit buňky CML mechanismem omezeným na HLA komplex jsou rozporuplné informace (54). Zdá se, že také T lymfocyty mohou existovat a nesou znaky jak CD4 tak CD8 pozitivní. Byla prokázána specifická aktivita T lymfocytů proti proteinu p210. Použití aktivovaných autologních T lymfocytů proto může mít své opodstatnění (55). Jedním z cílů je naučit imunitní systém znovu poznávat nádorové buňky v těle. Peptidy připravené z povrchu leukemických buněk mohou sloužit jako specifické antigeny pro stimulaci specifické protinádorové T-buněčné léčebné odpovědi (56). Interferon alfa je vysoce účinným lékem a v udržovací léčbě bude mít pravděpodobně klíčové postavení. Jeho použitím v relapsu onemocnění lze dosáhnout kompletní cytogenetické remise po alo-TKD (57) i auto TKD (40). V této době běží klinické studie s INF nebo s INF a IL-2 jako udržovací léčbou u CML po provedení auto-TKD, studie zkoušející vyvolat autologní GVHD pomocí aktivovaných LAK a NK buněk získaných z periferní krve (58-60). Z jiných imunoaktivních preparátů se testuje Linomide (61).

V rámci řešení grantového úkolu zahájilo naše pracoviště v roce 1998 studii s klinickým využitím autologního štěpu aktivovaného pomocí IL-2 u nemocných s CML s okamžitou krátkodobou jednoměsíční imunoterapií pomocí GM-CSF a IL-2 a následnou udržovací léčbou INF. Výsledky preklinických testů zaměřených na bezpečnost vlastní aktivace štěpu a určení množství vstupních buněk (hodnocení CFU-GM a CD34+ buněk) ve štěpu nezbytných k bezpečné ex vivo manipulaci byly provedeny na záložních štěpech nemocných, kteří v minulosti úspěšně podstoupili alogenní transplantaci. Výsledky jsou v tabulce č. 3. Pozorovali jsme nesignifikantní pokles CD34+ buněk a CFU-GM. Vitalita buněk vzrostla po 24hodinové kultivaci z původních 83 % na 96 %. Výsledky byly srovnatelné jak v pokusech s IL-2, tak pokusech kontrolních (data nejsou prezentována). Jednalo se o vstupní bezpečnostní experimenty, které měly potvrdit, že krátkodobou manipulací a kultiva-

ci IL-2 se štěpem u nemocných s CML nedochází k negativnímu ovlivnění kvality štěpu. Z proběhlých experimentů lze uzavřít, že v případě sběru dostatečného štěpu bude krátkodobá kultivace s IL-2 možná a pro nemocného bezpečná pokud nepůjde o nemocné výrazně předlžené, kde sběr štěpu PKB může být nedostatečný pro následně bezpečné přijetí štěpu (62).

Význam čistoty štěpu

Kontaminace štěpu u nemocných s CML kolísá podle použitého protokolu, sběru a především stavu onemocnění od 0% do 100 %, přičemž soudobé postupy „in vivo“ čištění dosahují až u 60 % časné odebraných štěpů nemocným v chronické fázi CML PhI negativitě (32). Bylo pozorováno, že čistota štěpu ovlivňuje procentuální zastoupení Ph+ a Ph- buněk v kostní dřeni po provedení auto-TKD (30). Vliv na udržení remise onemocnění zatím není znám.

Výše zmíněné metody „in vivo“ a „ex vivo“ čištění štěpu zpravidla nedokážou kompletně eradikovat nádorové buňky ze štěpu. Navíc především použití metod „ex vivo“ manipulací se štěpem vedlo k vyššímu počtu selhání štěpu a nebo prodloužení přijetí štěpu, což svědčí o poškození pluripotentních kmenových krvetvorných buněk při vlastním procesu (viz „ex vivo“ čištění štěpu). Jsou vyvíjeny nové metody, jak překonat tyto limitace metod současných. Izolace PhI negativních pluripotentních kmenových krvetvorných buněk z malého objemu krve (200 - 400 ml) u nemocných s CML a jejich následná expanze v „ex vivo“ kulturách se díky rychlému rozvoji

v této oblasti stává klinicky použitelnou metodou (63). Lze očekávat, že možnost kultivace a expanse pluripotentních kmenových krvetvorných buněk v krátké budoucnosti zásadním způsobem ovlivní sběr autologního štěpu i jeho čistotu, a to nejen u nemocných s CML.

Závěr

Chronickou myeloidní leukémií je možno vyléčit dle současných poznatků jen alogenní TKD. Autologní TKD se zdá velmi perspektivní alternativou léčby pro nemocné, kteří nemohou být alogenně transplantováni. Přínos takového postupu pro nemocné s CML musí potvrdit randomizované studie. Zatím není přesně ujasněn optimální stimulační režim a sběr kvalitního štěpu je více obtížným než u jiných nádorů. Rovněž kontaminace štěpu leukemickými buňkami je vyšší než u jiných nádorů. Klinické studie druhé generace s auto-TKD u nemocných s CML zařazují auto-TKD do léčebné strategie časné. Největším přínosem takové strategie bude nepochybně zvýšení bezpečnosti vlastní procedury. Z experimentálních postupů může být perspektivní vyvolání reakce GVL v podmínkách autologní transplantace a použití intenzivnější imunoterapie v rámci udržovací léčby. Rovněž pomnožení nenádorových kmenových krvetvorných buněk v tkáňových expanzích na dostatečné množství pro rychlé a dlouhodobé přijetí je intenzivně zkoumanou metodou, jejíž zavedení do praxe výrazně ovlivní sběr i čistotu štěpu.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 4710-2 a 4253-2

Literatura

- Miyamura, K., Barrett, A.J., Kodera, Y., Saito, H.: Minimal residual disease for bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect: a review of recent results. *Bone Marrow Transplant.* 14, 1994, s. 201 - 209.
- Kantarjian H.M., O'Brien S., Anderlini P and Talpaz M.: Treatment of chronic myelogenous leukemia: Current status and investigational options. *Blood* 1996, 87, s. 3069 - 3082.
- Mughal T.I., Goldman J.M.: Chronic myeloid leukaemia: A therapeutic challenge. *Ann Oncol.* 1995, 6, s. 637 - 644.
- Hansen, J. A., Gooley, T. A., Martin, P. J., Appelbaum, F. et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Engl J Med.* 1998, 338, s. 962 - 974.
- Lamparelli, T., van Lint, M. T., Gualandri, F., Occhini, D. et al.: Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia (CML) from unrelated donors and sibling donors: Single center experience. *Bone Marrow Transplant* 1997, 20, s. 1057-1064.
- Horowitz, M. M., Rowings, P. A., Passweg, J. R. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International bone marrow transplant registry. *Bone Marrow Transplantation*, 17, 1996, 3, s. 5 - 6.
- Cullis, J. O., Barrett, A. J., Goldman, J. M.: Graft vs. leukaemia reactions in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 28A, 1992, 12, s. 2069-2074.
- Munshi N. C., Govindarajan R., Drake R. et al.: Thymidine Kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remain fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir. *Blood*, 1997, 89, 4, s. 1334 - 1340.
- Gewirtz, A. M.: Treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) with c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Molecular Diagnosis and Hematology*, 1994, 57, udd.
- Goldman, J. M., Thang, K. H., Park, D. S. et al.: Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast cell transformation. *Br.J.Haematol.* 40, 1978, s. 185-195.
- Körbling, M., Burke, P., Braine, H. et al.: Successful engraftment of blood-derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exper Hematol.* 9, 1981, s. 684 - 690.
- Carella, A. M., Chimiri, F., Podesta, M. et al.: High-dose chemotherapy followed by autologous Philadelphia chromosome - negative blood progenitor cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 17, 1996, s. 201-205.
- Chalmers E. A., Franklin I. M., Kelsey S. M. et al.: Treatment of chronic myeloid leukaemia in first chronic phase with idarubicin and cytarabine: mobilization of Philadelphia-negative peripheral blood stem cells. *Br.J. Haematol.*, 1997, 96, s. 627 - 634.
- McGlave P., Miller J., Miller W. et al.: Autologous marrow transplant therapy for CML using marrow treated ex vivo with human recombinant interferon gamma. *Blood* 84, 537, 1994 (abstr. suppl.1).
- Reiffers J., Goldman J., Meloni G. et al.: Autologous stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: A retrospective analysis of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1994, 14, s. 407 - 415.
- Simonsson, B., Öberg, G., Killander, A. et al.: Intensive treatment in order to minimize the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia. *Stem Cells*, 11, 1993, 3, s. 73-76.
- McGlave, P. B., De Fabritius, A. et al.: Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: Results from eight transplant groups. *The Lancet*, 1994, 343, s. 1486 - 1488.
- Bhatia R., Verfaillie C. M., Miller J. S. and McGlave P. B.: Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1997, 89, 8, s. 2623-2634.
- Deisseroth A.B., Zhifei Zu, Claxton D. et al.: Genetic marking shows that Ph positive cells present in autologous transplant of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994, 83, s. 3068 - 3076.
- Reiffers, J., Mahon, F. X., Boiron, J. M. et al.: Autografting in chronic myeloid leukemia: an overview. *Leukemia*, 10, 1996, s. 385 - 388.
- Brito-Babapulle, F., Bowcock, S.J., Marcus, R.E. et al.: Autografting for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: peripheral blood stem cells may have finite capacity for maintaining haemopoiesis. *Brit J Haematol.* 1989, 73, s. 76 - 81.
- Haines, M. E., Goldman, J. M., Worsley, A. M. et al.: Chemotherapy and autografting for patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation: probable prolongation of life for some patients. *Brit J Haematol.* 58, 1984, s. 711-722.
- Hoyle, Ch., Gray, R., Goldman, J.: Autografting for patients with CML in chronic phase: an update. *Brit J Haematol.* 86, 1994, s. 76-81.
- Reiffers, J., Cahn, J. Y., Montastruc, M. et al.: Peripheral blood stem cell transplantation followed by recombinant alpha-Interferon for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: preliminary results. *Stem Cells*, 11, 1993, 3, s. 23-24.
- Johnson R. J., Owen R. G., Child J. A. et al.: Mobilization of Philadelphia-negative peripheral blood mononuclear cells in chronic myeloid leukaemia using hydroxyurea and G-CSF (filgrastim). *Brit J Haematol.* 1996, 93, s. 863 - 868.
- Krahl, R., Pönisch, W., Kubel, M. et al.: Peripheral stem-cell mobilization and autografting in patients with chronic myelogenous leukemia (CML): the Leipzig experience. *Blood*, 88, 1996, 10, s. 2304-2306.
- Mehta, J., Powles, R., Singhal, S. et al.: High-dose Hydroxyurea and G-

- CSF to collect Philadelphia - negative cells in chronic myeloid leukemia: preliminary results. *Leukemia and Lymphoma*, 23, 1996, s. 107-111.
28. Tringali S., Santoro A., Seimi R. et al.: High-dose cyclophosphamide for mobilization of circulating stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Eur. J. Haematol.*, 1994, 53, s. 1 - 7.
 29. Kantarjian H. M., Talpaz M., Hester, J. et al.: Collection of peripheral-blood diploid cells from chronic myelogenous leukemia patients early in the recovery phase from myelosuppression induced by intensive-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.*, 1995, 3, s. 553-559.
 30. Talpaz M., Kantarjian H., Liang J. et al.: Percentage of Philadelphia chromosome (Ph) - negative and Ph positive cells found after autologous transplantation for chronic myelogenous leukemia depends on percentage of diploid cell induced by conventional-dose chemotherapy before collection of autologous cells. *Blood* 1995, 85, s. 3257 - 3264.
 31. Hughes T. P., Grigg A., Szer J. et al.: Mobilization of predominantly Philadelphia chromosome-negative blood progenitors using cyclophosphamide and rHU-CSF in early chronic-phase chronic myeloid leukemia: correlation with Sokal prognostic index and haematological control. *Br. J. Haematol.*, 1997, 96, s. 635-640.
 32. Carella A. M., Podesta, M., Lerna, E. et al.: Mobilization/transplantation of Ph1 - negative blood progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Ann Oncol.* 7, 1996, 2, s. 19-22.
 33. Reiffers, J., Taylor, K., Gluckman, E., et al.: Ph-negative blood progenitor cells can be successfully collected with lenograstin in patients with chronic myeloid leukemia good responders to alpha-interferon. *Bone Marrow Transplantation* 1996, 17 (Suppl 1), s. 46 (abstr.).
 34. Fischer, T., Neubauer A., Mohm J. et al.: Chemotherapy-induced mobilization of karyotypically normal PBSC for autografting in CML. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 21, s. 1029-1036.
 35. Boiron, J. M., Cahn, J. Y., Carlo-Stella, C. et al.: Autologous stem cell transplantation (ASCT) for patients with chronic myeloid leukemia (CML) in first chronic phase (CP1) not responding to alpha-Interferon (INF). *Blood*, 88, 1996, 10, Suppl. 1, s. 491 (abstr. 492).
 36. Degliantoni G., Mangoni N., Rizzoli V.: In vitro restoration of polyclonal hematopoiesis in a chronic myelogenous leukemia after in vivo treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Blood* 1985, 65, s. 753.
 37. Verma U. N., Bagg A., Brown E. and Mazumder A.: Interleukin 2 activation of human bone marrow in long-term cultures: an effective strategy for purging and generation of anti-tumor cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13, 115 - 123.
 38. Jazwiec, B., Mahon, F. X., Pigneux, A. et al.: 5-fluorouracil resistant CD 34+ cell population from peripheral blood of CML patients contains BCR-ABL negative progenitors cells. *Exp. Haematol.*, 1996, 23, 14, s. 1509-1514.
 39. De Fabritiis P., Pettì M. C., Montefusco E., et al.: BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide in vitro purging and autologous bone marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in advances phase. *Blood* 1998, 91, 9, s. 3156 - 3162.
 40. Barnett M. J., Eaves C. J., Phillips G. L. et al.: Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: Results of a pilot study. *Blood* 1994, 84, p. 724 - 732.
 41. Verfaillie C. M., Miller, W. J., Boylan, K. and McGlave P. B.: Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*, 79, 1992, s. 1003 - 1010.
 42. Coulombel L., Kalousek D. K., Eaves C. J., Gupta C. M., Eaves A. C.: Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983, 308, s. 1493 - 1498.
 43. Mayer J., Voritček J.: Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových krvetvorných buněk v komplexní léčbě zhoubných nádorů. *Universitas Masaryk Brunensis*, 1997, s. 1-70.
 44. Devergie, A., Blaise, D., Aital, M. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: a randomized trial of Busulfan-Cytosin versus Cytosin - total body irradiation as preparative regimen: a report from the French Society of Bone Marrow Graft (SFGM). *Blood*, 85, 1995, 8, s. 2263-2268.
 45. Rule S. A., Savage D. G., O'Brien S. G. et al.: Intermediate-dose busulfan before autografting for advanced-phase chronic myeloid leukaemia. *Brit J Haematol.* 1996, 94, 4, s. 694-698.
 46. Gale, R. P., Hehlmann R., Zhang M.-J. et al.: Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1998, 91, 5, s. 1810-1819.
 47. Guilhot, F., Chastangn, C., Michallet, M., Guerci, A. et al.: Interferon alpha 2b (IFN) combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *A Engl J Med* 1997, 337, s. 223-232.
 48. Barrett A. J., Malkovska V.: Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 1996, 93, s. 754 - 761.
 49. Jones, R. J., Hess, A.: Autologous graft-versus-host disease. In: Spitzer T., Mazumder A: *Immunotherapy and Bone Marrow Transplantation*. Armonk, NY Futura Publishing, 1995, s. 59 - 69.
 50. Masumoto, C., Benyunes, M. C., et al.: Close stimulation of acute graft-versus host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17, s. 351 - 356.
 51. Benyunes M, Masumoto C., Higuchi C., et al: Interleukin-2+ lymphokine-activated killer cells as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia: A preliminary report. *Bone Marrow Transplant.* 1993, 12, s. 159-163.
 52. Verma, U.N., Charak B.S., et al.: Interleukin-2 in Bone Marrow Transplantation. In Buckner D (ed): *Technical and biological components of marrow transplantation*. Kluwer Ac. Publishers, Boston, 1995, s. 315 - 332.
 53. Scheffold, C., Brandt, K., et al.: Potential of autologous immunologic effector cell for bone marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone marrow transplant.*, 1995, 15, s. 33 - 39.
 54. Lewalle, P., Hensel, N., et al.: Helper and cytotoxic lymphocyte responses to chronic myeloid leukemia: implications for adoptive immunotherapy with T cells. *Brit J Haematol.*, 92, 1996, s. 587 - 594.
 55. Bocchia M., Koronsvit T., Xu Q. et al.: Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996, 87, s. 3587 - 3590.
 56. Buzyn A., Kemmla M., Connan F., et al.: CML patient in hematologic remission can mount a cytotoxic T cell response in vitro against the natural peptides eluted from his CML cells. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21 (Suppl. 1), abstr. 229.
 57. Pigneux A., Devergie A., Pochitaloff M. et al.: Recombinant alpha-interferon as treatment for chronic myelogenous leukemia in relaps after allogeneic bone marrow transplantation: A report from the Society Française de Greffe de Moelle. *Bone Marrow Transpl* 1995, 15, s. 819 - 824.
 58. Barrett A. J., Muvroudis D., J. Mollidrem et al.: Immune modulation to treat leukemic relapse following allogeneic bone marrow transplantation: a risk-based sequential approach. *Blood* 1996, 88, 10 Suppl 1, s. 675a (abstr 2687).
 59. Rodrigues G., Goodman M., Restrepo A. et al.: Efficacy of low dose IL-2 in CML blast crisis and accelerated phase. *Blood* 1996, 88, 10 Suppl 1, s. 675a (abstr 2687).
 60. Schiller G., Lee M., Sawyers C. L. et al.: A phase I/II study of IL-2 to enhance the antileukemia effect of alpha-interferon in the treatment of chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996, 88, 10 Suppl 1, s. 675a (abstr 2687).
 61. Rowe J., Ryan D., Dipasio J., Nilsson B. et al.: Autografting in chronic myelogenous leukemia followed by immunotherapy. *Stem Cells* 1993, 11, Suppl 3, s. 34 - 41.
 62. Bhatta, R., McGlave, P. B., Dewald, G. W., Blazar, B. R., Verfaillie, C. M.: Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: Role of malignant stromal macrophages. *Blood* 1995, 85, 3636-3642.
 63. Verfaillie, C. M., Bhatta, R., Miller, W. et al: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*, 87, 1996, 11, s. 4770-4779.
 64. Hazel, D. L., Kelsey S. M. N., Baksh N et al.: Peripheral blood stem cell transplantation (PBST) for chronic granulocytic leukaemia. *Brit J. Haematol.* 93 (suppl. 1), 17 (abstr.).