

VÝZNAM SELEKCE CD 34+ PROGENITORŮ U NEMOCNÝCH S NON-HODGKINSKÝM LYMFOMEM LÉČENÝCH VYSOKODÁVKOVANOU CHEMOTERAPIÍ S NÁSLEDNOU AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACÍ KRVE-TVORNÝCH BUNĚK

THE SIGNIFICANCE OF CD 34+ PROGENITORS SELECTION FOR PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA TREATED WITH AUTOLOGOUS STEM CELLS TRANSPLANTATION

VÁLKOVÁ V.¹, TRNĚNÝ M.¹, SLABÝ J.¹, MATĚJČKOVÁ Š.², VODVÁŘKOVÁ Š.², GAŠOVÁ Z.², MARINOV I.², JELÍNEK J.², APLTAUEROVÁ M.¹, PROCHÁZKA B.³, KARBAN J.¹, KLENER P.¹

¹ I. INTERNÍ KLINIKA I. LF UK A VFN, PRAHA

² ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

³ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, FNKV, PRAHA

Souhrn: *Cíl:* Srovnání kinetiky a bezpečnosti příhojení a porovnání doby přežití bez relapsu/progrese nebo úmrtí (EFS) a celkového přežití (OS) u nemocných léčených pro non-Hodgkinský lymfom vysokodávkovanou chemoterapií a následně autologně transplantovaných selektovaným versus neselektovaným štěpem. *Soubor a metodika:* Hodnoceno bylo celkem 35 pacientů, 12 nemocných bylo transplantováno štěpem po CD 34+ selekci, kontrolní skupina 23 neselektovaných pacientů byla vybrána (v poměru 1:2) tak, aby stav onemocnění v době transplantace odpovídal selektované skupině. Při statistickém zpracování neparametrických dat byl využit počítačový program EpiInfo 6, analýza přežití byla zpracována Kaplan-Meierovou metodou, pro statistickou významnost rozdílu byl použit log-rank test. *Výsledky:* 1. Medián příhojení v trombocytech nad $20 \times 10^9/l$ byl ve skupině neselektovaných pacientů 11 dní, ve skupině selektovaných 14,5 dne ($p < 0,05$) stejně tak byl signifikantní rozdíl v mediánu příhojení v trombocytech nad $50 \times 10^9/l$ – 15 vs 22 ($p < 0,05$). Rovněž medián příhojení v granulocytech nad $0,5 \times 10^9/l$ byl signifikantně nižší ve prospěch neselektované skupiny (10 dnů proti 11), stejně pak v leukocytech nad $1,0 \times 10^9/l$ (10 dnů proti 11) ($p < 0,05$). Absolutní doba leukopenie, rozdělená do 3 stupňů podle závažnosti (počet dnů s leukocyty pod 1, 0,5 a $0,2 \times 10^9/l$) byla ve všech 3 parametrech signifikantně delší ve skupině selektovaných pacientů. Medián dnů febrilní neutropenie, 2,5 dne ve skupině neselektovaných se statisticky významně nelišil od selektované skupiny (medián 4,5 dne). 2. Pravděpodobnost přežití (OS) ve 3 letech pro celý soubor byla 63,5%, při porovnávání obou skupin pak 75% pro selektované a 57,3% pro neselektované nemocné. Pravděpodobnost přežití bez úmrtí či relapsu (EFS) byla ve 3 letech pro celý soubor 35,9% resp. 33,3% pro selektovanou a 37,2% pro neselektovanou skupinu. Medián sledování byl 33,5 měsíce (12-61) pro skupinu selektovaných a 32 měsíců (7-73) pro neselektované nemocné. Medián období od transplantace do relapsu či progrese byl 21 měsíců (4-25 měsíců) u selektovaných a 8 měsíců (0,8-37 měsíců) u neselektovaných pacientů (rozdíl byl statisticky nevýznamný). *Závěry:* Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v přežití pacientů, měřený OS a EFS ve 3 letech. Rovněž medián období od transplantace do relapsu se statisticky významně nelišil. Pomalejší kinetika příhojení, kterou jsme pozorovali ve skupině selektovaných pacientů, byla pravděpodobně důsledkem nižšího počtu CD 34+ progenitorů u selektovaných nemocných v důsledku jejich ztrát při zpracování a manipulaci. Vzhledem k jejich dostatečnému absolutnímu počtu se však neprojevila větším počtem komplikací.

Klíčová slova: non-Hodgkinský lymfom, autologní, transplantace, selekce, CD34+.

Summary: *Purpose:* The comparison of kinetics and safety of hematopoietic reconstitution and time to relaps/ progression (EFS) and overall survival (OS) of patients with non-Hodgkin's lymphoma undergoing ASCT, transplanted with selected or non selected harvest. *Patients and methods:* On the whole 35 transplanted patients were evaluated, 12 with CD 34+ selected harvest and as a control, group of 23 patients with non selected harvest transplanted. The control group was selected in 1:2 proportion, according to the disease status at time of transplantation (equal for both groups). For statistical analysis of non-parametric values we used the software program EpiInfo6, survival times (EFS and OS) were calculated using the Kaplan-Meier method. Comparisons of these times to event distributions were made using the log-rank test. *Results:* 1. Median of thrombocyte engraftment over $20 \times 10^9/l$ was 11 days for non-selected patients, resp. 14,5 days for selected group ($p < 0,05$), also the median of thrombocyte engraftment over to $50 \times 10^9/l$ was significantly lower for non-selected – 15 vs 22 ($p < 0,05$). As well the median of granulocyte engraftment over $0,5 \times 10^9/l$ was significantly lower in favor of the non-selected group (10 vs 11 days), equally for leucocyte engraftment up to $1,0 \times 10^9/l$ (10 vs 11 days) ($p < 0,05$). Absolute period of leucopenia, divided into 3 grade (number of days with leucocytes under 1, 0, 0,5, and $0,2 \times 10^9/l$) was for all 3 grades significantly longer in the selected group. Median of days of febrile neutropenia (2,5 days for the non-selected group) was not significantly different in comparison to the selected group (median 4,5 days). 2. The overall survival probability (OS) at 3 years for all patients was 63,5% represented by 75% and 57,3% for selected and non-selected group respectively. Event free survival probability (EFS) at 3 years was 35,9% for all patients, resp. 33,3% for selected and 37,2% for non-selected patients. Median follow-up was 33,5 months (12-61) for group of patients with selected harvest transplanted and 32 month (7-73) for non-selected group. Median time to relaps or/ progression measured from transplantation date was 21 months (4-25 months) for selected and 8 months (0,8-37 months) for non-selected patients (NS differ). *Conclusions:* We have not found the significant difference in survival between both groups of patients measured by OS and EFS at 3 years. Also the median time to relaps was not different. The slower kinetics of hematopoietic reconstitution observed in group of selected patients was probably caused by lower CD 34+ progenitors number in selected harvests because of their lost during ex vivo manipulation. However, in consequence of their sufficient absolute numbers, the complications rate was similar in both groups.

Keywords: non-Hodgkin's lymphoma, autologous, transplantation, selection, CD 34+

Úvod

Vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologních kmenových buněk (ASCT) je efektivní a široce užívaná metoda léčby řady hematologických malignit a některých solidních tumorů (Horowitz, 1997). Ve srovnání s allogenní transplantací je výhodou relativně nízká peritransplantační mortalita (méně než 5%) a odpadající nutnost hledání vhodného dárce. Na druhé straně však zůstává hlavním problémem relativně vysoká míra relapsů (signifikantně vyšší než po allogenní transplantaci u většiny malignit). Příčinou terapeutické výhody allogenních kmenových buněk ve smyslu nižšího počtu relapsů základního onemocnění spočívá nejspíše v chybění imunitně podmíněného tzv. graft-versus leukemia (lymphoma) (GVL) efektu u autologních transplantací (Champlin, 1999). Za zdroj relapsů jsou obecně považovány přežívající nádorové buňky v organismu nemocného, nedostatečně eradikované terapií a dále se uvažuje o možném vlivu reinfuze nádorových buněk zpět pacientovi v kontaminovaném štěpu, eventuálně o kombinaci obou faktorů. Jednou z možností jak zabránit reinfuzi potenciálních klonogenních buněk zpět pacientovi jsou na různém principu založené metody ex vivo čištění štěpu. Patří sem jednak inkubace s cytotatiky (Hrubá, 1997), inkubace se směsí monoklonálních protilátek s následnou lýzou komplementem (Gribben, 1991) a v posledním řadě selekce CD 34 pozitivních (kmenových) krvetvorných buněk event. spojená s negativní selekcí buněk nesoucích určitý antigen a využívající automatické systémy (Cell Pro, Isolex Baxter, CliniMacs Miltenyi). Přes některé údaje podporující význam přítomnosti nádorových buněk ve štěpu (Gribben 1991, Rill 1994, Pilar-ski 2000), jednoznačné potvrzení významu čištění štěpu pro zlepšení až již EFS nebo OS nebylo dosud podáno. V naší analýze jsme se zaměřili formou párované retrospektivní analýzy na porovnání výsledků u nemocných transplantovaných pro NHL pomocí CD34+ selektovaného štěpu se skupinou kontrolní transplantovanou neselektovaným štěpem.

Soubor a použité metodiky

Výběr a charakteristika pacientů: V našem souboru jsme retrospektivně hodnotili celkem 35 pacientů léčených pro non-Hodgkinský lymfom vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. 12 nemocných bylo transplantováno selektovaným štěpem, kontrolní skupina 23 pacientů, (poměr selektovaných k neselektovaným 1:2, navíc pak 1 nemocný v každé skupině transplantovaný tandemově), kteří byli transplantováni neselektovaným štěpem byla vybrána tak, aby jejich stav onemocnění hodnocený v době transplantace byl srovnatelný. V dalším hodnocení jsme se pokusili srovnat některé faktory vztahující se k charakteristikám onemocnění v době transplantace, ke kinetice příhojení, peritransplantační toxicitě a následně dalšímu osudu nemocných po transplantaci v obou skupinách.

Definice: Období bez významné události (EFS) bylo definováno jako doba od transplantace do relapsu/progrese či úmrtí. Zvláště byl spočítán medián období od transplantace do progrese/relapsu, měřeno v měsících. Přežití nemocných (OS) bylo definováno jako interval od transplantace do úmrtí. Medián sledování byl stanoven u žijících nemocných.

Odpověď na terapii: jako kompletní remise (KR) byl hodnocen stav bez klinických i laboratorních známek choroby a úplná normalisace původního patologického nálezu. Jako parciální remise (PR) byl hodnocen stav, kdy bylo léčbou dosaženo více než 50% redukce původního patologického nálezu.

Pro hodnocení odpovědi na terapii v období transplantace jsme nemocné rozdělili do dalších skupin: na nemocné transplantované v rámci indukční terapie z důvodů rizikových faktorů při diagnóze (skupina 1) – nemocní dosáhli KR, (skupina 2) – nemocní byli v PR, na nemocné transplantované po dosažení 2. nebo další KR po záchranné terapii pro relaps (skupina 3),

nemocné transplantované v 2. nebo další PR po záchranné terapii pro relaps (skupina 4) a na nemocné, kteří byli transplantováni v 1.PR z důvodu nemožnosti dosáhnout indukční terapií kompletní remise (skupina 5).

Metodiky

1. Stanovení a hodnocení rozsahu onemocnění

Hodnocení rozsahu onemocnění bylo prováděno standardními zobrazovacími metodami:

Obligátně: rentgenová, ultrasonografická vyšetření, počítačová tomografie (CT).

V individuálních případech: nukleární magnetická resonance (MRI), galiová scintigrafie, eventuelně pozitronová emisní tomografie (PET).

Hodnocení postižení kostní dřevě: histologie, průtoková cytometrie, v individuálních případech molekulární biologie (PCR)

A. Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byl zjišťován imunofenotyp lymfocytárních populací ve vzorcích krve, kostní dřevě, tkáně uzlin, dle nutnosti i v mozkomíšním moku a v různých punktátech. Přítomnost CD znaku byla prokazována jednostupňovým značením (tzv. přímá imunofluorescence) monoklonálními protilátkami s navázaným fluorochromem FITC (Fluorecein isothiocyante) nebo PE (R- Phycoerythrin). Současně jsme vyšetřovali dva znaky, kde jedním byl tzv. „lineage marker“ (tj. znak specifický pro určitou buněčnou linii, např. CD 19 pro B lymfocyty), druhým byl znak, jehož exprese nás u dané buněčné linie zajímala. Používali jsme protilátky (Immunotech) proti následujícím znakům: CD3(UCHL1), CD4 (13B8.2), CD5 (BL1a), CD8 (B9.11), CD10 (ALB2), CD11c (BU15), CD14(RMO52), CD19(J4.119), CD20 (HRC20), CD38 (T16), CD45 (J.33), FMC7, HLA DR (B8.122), lehké řetězce KAPPA(J4.119), lehké řetězce LAMBDA (J4.119), IgD, IgM, isotypové kontroly (IgG1/IgG1).

Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson). Udávaná citlivost přístroje je $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-4}$ buněk

B. Ostatní vysoce citlivé metody - molekulárně biologické - využívající různé modifikace PCR, klonogenní pokusy (in vitro kultivace nádorových linií) byly v našem souboru použity pouze u některých nemocných a proto nejsou dále rozváděny

2. Selekce

Principem CD34+ selekce je vychytávání kmenových buněk nesoucích CD 34 antigen.

Positivní selekce vede kromě izolace cílových CD34+buněk k nepřímému odstranění nežádoucích buněk včetně nádorových u různých typů maligních onemocnění (Mapara, 1997, Civin, 1996). Další potenciální výhodou je zmenšení objemu buněčné suspenze a tím i snadnější skladování a při transplantaci menší zatížení organismu převáženým dimetylsulfoxidem a objemem tekutin.

V souboru našich pacientů byly jako metodiky pro selekci použity systémy CellPro a Isolex

Cell-Pro

Positivní selekce pomocí přístroje CellPro (Bothell, WA USA) umožňuje vychytání kmenových buněk nesoucích CD34 antigen jak z kostní dřevě, tak z PBPC. Celý proces selekce je řízen počítačem, do průběhu jednotlivých kroků lze manuálně zasahovat. Používané protilátky jsou myší anti CD34 monoklonální protilátky s navázaným biotinem. Silná afinita mezi avidinem a biotinem způsobuje, že CD34+ buňky s navázanými protilátkami s biotinem se naváží na kuličky potažené avidinem v koloně přístroje a jsou zde vychytány, zatímco neoznačené buňky projdou a jsou zachyceny jako negativní frak-

ce. Vychytnané kmenové buňky se uvolní mechanicky mírnou rotací, při které dochází k přerušení vazby mezi kmenovou buňkou a protilátkou, a jsou sebrány jako pozitivní frakce.

Imunomagnetická selekce na přístroji Isolex 300i (software verze 1,12 a 2,5)

Systém Isolex 300i (sw 2,5) je plně automatický a umožňuje výběr pozitivní nebo jednokrokové pozitivní/negativní selekce. Základní kroky jsou shodné v obou procesech, kombinovaný proces však vykazuje vyšší depleci nežádoucích buněk ve srovnání se samotnou pozitivní selekcí. Tvorba rozet CD34+ buněk s imunomagnetickými kuličkami probíhá před negativní selekcí. Během tvorby rozet je buněčná suspenze, předem sensibilizovaná anti-CD34+ protilátkou, smísená s imunomagnetickými kuličkami v separační komoře. Po vytvoření rozet jsou tyto zadrženy magnetickým polem v separační komoře a necílové buňky jsou převedeny do vaku pro negativní frakci. Systém opakuje tento proces třikrát pro dokonalé převedení necílových buněk do negativní frakce. Bezprostředně před třetím promytím jsou přidány protilátky proti cílovým buňkám a suspenze je 15min inkubována. Po senzibilizaci cílových buněk je dokončeno třetí promytí a buňky jsou resuspendovány v separační komoře a připraveny k uvolňovacímu kroku. Uvolnění CD34+ buněk probíhá současně s tvorbou rozet cílových buněk pro depleci. V separační komoře jsou magnetickým polem zachyceny rozety depletovaných buněk a volně imunomagnetické kuličky. CD34+ buňky jsou po zakoncentrování převedeny do finálního vaku.

Kombinace pozitivní a negativní selekce vede k optimální depleci nádorových buněk ze štěpu odstraněním kontaminujících nádorových buněk a tím redukcí minimální reziduální choroby.

4. Statistika

Při zpracování neparametrických dat jsme použili softwarový program EpiInfo6 s využitím neparametrických testů Mann Whitneyova a Wilcoxonova. Analýza přežití byla zpracována Kaplan-Meierovou metodou, statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla stanovena pomocí log-rank testu. Testování bylo prováděno na hladině významnosti 0,05.

Výsledky

1. Srovnání obou skupin nemocných v základních charakteristikách v době od diagnózy do transplantace:

V celém souboru jsme retrospektivně hodnotili celkem 35 pacientů. 12 pacientů bylo transplantováno pomocí selektovaného štěpu, z toho u 8 byla selekce prováděna pomocí přístroje CellPro a u 4 pomocí přístroje Isolex 300i. U 23 pacientů selekce prováděna nebyla. Kontrolní skupina 22 pacientů byla vybrána tak, aby se v základních parametrech stavu onemocnění v době před transplantací shodovala se skupinou selektovaných nemocných (v poměru 1:2). 1 neselektovaný pacient navíc byl vybrán jako kontrolní k 1 nemocnému v selektované skupině, oba byli transplantováni tandemově. V obou skupinách byla obě pohlaví zastoupena stejnoměrně, rovněž věkový medián (53 let u selektovaných a 49 let u neselektovaných) se významně nelišil. V celém souboru bylo zastoupeno celkem 6 pacientů s lymfomem z plášťových buněk / MCL / (4 ve skupině selektovaných, 2 v neselektovaných), 21 s folikulárním lymfomem / FCL / (7/14), 6 difusních velkobuněčných lymfomů / DLCL / (1/5) a u 2 nemocných ve skupině neselektovaných se jednalo o B lymfomy blíže nezařazené. Rovněž rozložení jednotlivých histologických typů lymfomů se v obou skupinách statisticky významně nelišilo.

Pokročilost a rozsah onemocnění jsme hodnotili pomocí mezinárodního prognostického indexu (IPI) (Shipp, 1993), klinického stadia (Ann Arbor staging systém pro lymfomy) a postižení kostní dřeně. Vyšetření a hodnocení postižení kostní dřeně bylo prováděno mikroskopicky a pomocí průtokové cytometrie. Vysoce citlivé metody (molekulární biologie)

byly použity jen u několika pacientů, proto dále nebyly do analýzy zahrnuty.

Tyto parametry jsme hodnotili jak při diagnóze, tak před mobilisací a následnou transplantací. Iničiální IPI a klinické stadium byly v obou skupinách srovnatelné, rozdíl v postižení kostní dřeně byl na hranici statistické významnosti ($p=0,069$), 10 ze 12 selektovaných mělo iničiální postižení kostní dřeně oproti 11 z 23 ve skupině neselektovaných. V době před transplantací byly opět oba soubory srovnatelné z hlediska IPI, statisticky významně se však lišily v postižení kostní dřeně před sběrem krvetvorných buněk, kdy ve skupině selektovaných pacientů mělo infiltraci kostní dřeně celkem 9 (75%) nemocných, zatímco ve skupině neselektovaných byla infiltrace zjištěna pouze u 2 (8,6%). V důsledku výše uvedeného rozdílu v postižení kostní dřeně, bylo též zastoupení nemocným s vyšším klinickým stadiem v době před transplantací větší ve skupině selektovaných. (Tabulka č. 1)

Tabulka č. 1. Porovnání obou skupin v základních charakteristikách v době diagnózy:

	selektováni 12	neselektováni 23	P
Muži	6	12	NS
Ženy	6	11	NS
Věkový medián (roky)	53 (30-68)	49 (35-63)	NS
Histologický typ lymfomu:			NS
MCL	4	2	
FCL	7	14	
DLCL	1	5	
B blíže neurč	0	2	
Iničiální klinické stadium			NS
H (III, IV)	10	21	
L (I, II)	2	2	
Iničiální IPI			
H (2,3)	2	9	
L (0,1)	10	14	NS
Iničiální postižení kostní dřeně			0,069
Ano	10	11	
Ne	2	12	

L = low (nízké)
H = high (vysoké)

Za jeden z nejvýznamnějších faktorů, určujících další osud nemocných je považován stav onemocnění v době transplantace, jehož měřítkem byl v našem souboru mezinárodní prognostický index (IPI). Odpověď na terapii jsme hodnotili pomocí 7 stupňů: 1 kompletní remise, 2 plánovaná první parciální remise, 3 druhá a další kompletní remise, 4 druhá a další parciální remise, 5 první parciální remise – nedostatečný efekt úvodní léčby, 6 primárně resistantní onemocnění, 7 resistantní relaps onemocnění. V našem souboru byly zastoupeny pouze odpovědi 1-5. Rovněž v takto hodnocené odpovědi na terapii před transplantací se oba soubory statisticky významně nelišily. Celkem bylo před transplantací dosaženo 12 remisí (2 KR a 10 PR), tj. 100% odpovědi ve skupině selektovaných a 23 remisí (10 KR a 13 PR), tj. rovněž 100% odpovědi ve skupině neselektovaných. Žádný ze sledovaných nemocných nebyl transplantován ve fázi resistantní choroby.

Míru předléčení v obou sledovaných skupinách jsme hodnotili počtem cyklů chemoterapie, podaných před transplantací, jejichž medián byl srovnatelný 9,5 (4-23) u selektovaných a 9,0 (3-18) ve skupině neselektovaných. Medián doby od diagnózy do transplantace byl v obou skupinách srovnatelný - 13 měsíců ve skupině selektovaných resp. 11 měsíců ve skupině neselektovaných. (Tabulka č.2)

Tabulka č.2. Porovnání obou skupin podle stupně předlčení a pokročilosti choroby v době před transplantací:

	selektováni 12	neselektováni 23	p
počet cyklů předchozí terapie M	9,5 (4-23)	9,0 (3-18)	NS
Postižení KD před ASCT: ano	9	2	p<0,05
ne	3	21	
IPI před ASCT: (0,1) L	9	22	NS
(2,3) H	3	1	
Klinické stadium před ASCT:			p<0,05
(I,II) L	2	14	
(III,IV) H	10	9	
* Stav při ASCT: 1	1	4	NS
2	2	2	
3	1	3	
4	6	12	
5	2	2	
Remise celkem před ASCT: (KR+PR)	12	22	NS
KR	2	10	
PR	10	13	
Doba od dg do transplantace (medián-měsíce)	13,3 (5,9- 94,1)	11,3 (4,4- 51,2)	NS

M = medián
H = high (vysoké)
L = low (nízké)

- *
Skupina 1: transplantace jako plánovaná součást indukční léčby – nemocný již byl v KR
Skupina 2: transplantace jako plánovaná součást indukční léčby – nemocný byl ještě v PR
Skupina 3: transplantace po dosažení 2. nebo následně KR po záchranné léčbě pro relaps
Skupina 4: transplantace po dosažení 2. nebo následně KR po záchranné léčbě pro relaps
Skupina 5: transplantace v 1. PR z důvodu nemožnosti dosáhnout indukční terapií i terapií 2. linie KR

2. Použité transplantační režimy a parametry převedených progenitorů

Jako přípravné režimy (vysokodávkovaná chemoterapie) byly použity: BEAM 400 (8x) (Trněný, 1998), BEAM 200 (22x), TBI-CFA (3x) a 2 pacienti (v každé z obou skupin 1 nemocný) byli léčeni tandemovou transplantací (1. fáze Melfalan + Mitoxantron, 2. fáze BEAM 200). Všechny uvedené režimy jsou součástí standardních protokolů pro ASCT na našem pracovišti. Zastoupení jednotlivých režimů se v obou skupinách statisticky významně nelišilo. Celkem 34 nemocných (12 selektovaných a 22 neselektovaných) bylo transplantováno mobilisovanými periferními kmenovými buňkami, pouze u jedné nemocné byla jako zdroj krvetvorných buněk použita kostní dřev. Kvalitu štěpů v obou sledovaných skupinách jsme hodnotili absolutním počtem CD 34+ buněk ($\times 10^6/\text{kg}$) a absolutními hodnotami CFU-GM ($\times 10^4/\text{kg}$). Zde se oba soubory statisticky významně lišily v počtu CD 34+ buněk, jejichž medián byl ve skupině selektovaných $3,19 \times 10^6/\text{kg}$ oproti $6,4 \times 10^6/\text{kg}$ ve skupině neselektovaných ($p < 0,05$). Rozdíl v mediánu počtu CFU-GM byl v obou skupinách statisticky nevýznamný. (Tabulka č.3)

3. Srovnání parametrů kinetiky přihojení a peritransplantační toxicity

Při srovnávání standardních parametrů kinetiky přihojení jsme v našem souboru našli statisticky významný rozdíl v mediánu přihojení ve prospěch skupiny pacientů transplantovaných neselektovaným štěpem. Medián přihojení v trombocytech nad $20 \times 10^9/\text{l}$ byl ve skupině neselektovaných pacientů 11 dní (6-16), ve skupině selektovaných 14,5 dne (9-32), stejně tak byl signifikantní rozdíl v mediánu přihojení v trombocytech nad

Tabulka č. 3. Použité transplantační režimy a parametry převedených progenitorů

	selektováni 12	neselektováni 23	p
přípravný režim :			NS
BEAM 400	1	7	
BEAM 200	7	15	
TBI-CFA	3	0	
Tandem	1	1	
CD 34+ v PBPC ($\times 10,6/\text{kg}$) M	3,19 (1,67- 12,98)	6,4 (1,15-24,16)	p<0,05
CFU-GM v PBPC ($\times 10,4/\text{kg}$) M	25,65 (1,1-163,9)	50,7(1,28-174,3)	NS
ANC v BM ($\times 10,8/\text{kg}$)		3,0	
CFU-GM v BM ($\times 10,4/\text{kg}$)		13,88	
Transplantace PBPC	12	22	
BM	0	1	

M = medián

$50 \times 10^9/\text{l} - 15$ vs 22. Rovněž medián přihojení v granulocytech nad $0,5 \times 10^9/\text{l}$ byl signifikantně nižší ve prospěch neselektované skupiny (10 dnů proti 11), stejně pak v leukocytech nad $1,0 \times 10^9/\text{l}$ (10dnů proti 11). V korelaci s protražovanějším přihojením byl též signifikantně větší počet podaných erymas a trombokonzentrátů ve skupině selektovaných nemocných. Absolutní doba leukopenie, rozdělená do 3 stupňů podle závažnosti (počet dnů s leukocyty pod 1, $0,5$ a $0,2 \times 10^9/\text{l}$) byla ve všech 3 parametrech signifikantně delší ve skupině selektovaných pacientů. Tato skutečnost se však neodrazilila v komplikacích periody leukopenie, měřené počtem febrilních dnů v tomto období, jejichž medián 2,5 dne ve skupině neselektovaných se statisticky významně nelišil od selektované skupiny (medián 4,5 dne). Rovněž peritransplantační mortalita (2 úmrtí ve skupině selektovaných a 1 ve skupině neselektovaných do 100 dnů po transplantaci) se významně nelišila. (Tabulka č.4)

Tabulka č. 4. Srovnání parametrů přihojení a peritransplantační toxicity

	selektováni 12	neselektováni 23	p
přihojení v trombo nad 20 M ($\times 10,9/\text{l}$) D	4,5 (9-32)	11 (6-16)	p<0,05
přihojení v trombo nad 50 M ($\times 10,9/\text{l}$) D	22 (11-53)	15 (9-40)	p<0,05
ANC nad $0,5 (\times 10,9/\text{l})$ D M	11 (10-13)	10 (8-13)	p<0,05
WBC nad $1,0 (\times 10,9/\text{l})$ D M	11 (10-13)	10 (8-13)	p<0,05
počet dnů s leuko pod 0,2 M	5 (2-10)	3 (0-9)	p=0,05
počet dnů s leuko pod 0,5 M	8 (6-12)	6 (3-11)	p<0,05
počet dnů s leuko pod 1,0 M	9 (7-14)	8 (5-13)	p<0,05
počet trombokonzentrátů M	6 (2-10)	3 (1-7)	p<0,05
počet erymas M	6 (2-14)	4 (0-10)	p<0,05
počet febrilních dnů M	4,5 (0-17)	2,5 (0-9)	NS
počet úmrtí do 100 dnů po ASCT	2	1	NS

M = medián

4. Dosažená odpověď a sledování po ASCT

Hodnotitelných bylo ve skupině selektovaných 11 pacientů, z nichž u všech 11 bylo dosaženo léčebné odpovědi (100%), z toho 7 (64%) kompletních a 4 (36%) parciální remise. 1 nemocná ve skupině selektovaných zemřela 26. den po transplantaci na sepsi, odpověď na léčbu nebyla hodnotitelná. 1 pacient zemřel 37. den na infekční komplikaci v kompletní remisi. U neselektovaných pacientů bylo léčebné odpovědi dosaženo u všech 23 (100%), z toho 16 (70%) kompletních a 7 (30%) parciálních remisí. 1 pacient zemřel 30. den na sepsi, v kompletní remisi.

Tabulka č. 5. Odpověď na léčbu a sledování:

	selektovaní 12	neselektovaní 23	p
Nejlepší výsledek po ASCT: KR	7	16	NS
PR	4	7	
časné úmrtí	2	1	NS

Progrese / relaps	5	14	NS
Úmrtí	3	10	NS
Remise celkem : KR+PR	6	10	NS
KR	5	9	
PR	0	1	
Medián sledování od BMT- měsíce	33,5 (12-61)	32 (7-73)	NS
Medián od BMT do relapsu- měsíce	21,2 (4,4-25,0)	8,1 (0,8-37,1)	NS

Tabulka č. 6. Výsledky přežití:

	celkem % (CI 95%)	selektovaní % (CI 95%)	neselektovaní % (CI 95%)	p
OS ve 3 letech	63,5% (45,6-81,4)	75% (50,5-99,5)	57,3% (33,8-80,8)	NS
EFS ve 3 letech	35,9% (18,3-53,5)	33,3% (3,5-63,1)	37,2% (15,6-58,8)	NS

V parametrech dosažení odpovědi se tedy oba soubory výrazněji nelišily. V dalším sledování došlo k progresi/relapsu onemocnění u 5 pacientů (42%) ve skupině selektovaných a u 14 pacientů (40%) ve skupině neselektovaných. Rozdíl byl opět nesignifikantní. Medián období od transplantace do relapsu či progresi byl 21 měsíců (4-25 měsíců) u selektovaných a 8 měsíců (0,8-37 měsíců) u neselektovaných pacientů. Rozdíl byl statisticky nevýznamný ($p=0,458$). Zemřeli celkem 3 pacienti (25%) v souboru selektovaných (z toho 2 časné úmrtí na infekční komplikace, 26., resp. 37. den po transplantaci) a 10 pacientů (43%) v souboru neselektovaných nemocných. (1 časné úmrtí na sepsi 30. den po transplantaci) ($p=0,46$). V mediánu sledování (u nemocných žijících v době hodnocení), který byl 33,5 měsíců (12-61) u selektovaných a 32 měsíců (7-73) u neselektovaných, bylo v remisi 6 (50%) pacientů ve skupině selektovaných (všichni v kompletní remisi), ve skupině neselektovaných bylo v remisi celkem 10 (43%), z toho 9 (39%) v kompletní a 1 (4%) v parciální remisi. ($p=0,66$). (Tabulka č. 5)

Pravděpodobnost přežití (OS) ve 3 letech pro celý soubor byla 63,5% (CI 95%; 45,6-81,4), při porovnávání obou skupin pak 75% (CI 95%; 50,5-99,5%) pro selektované a 57,3% (CI 95%; 33,8-80,8%) pro neselektované nemocné. (Graf č. 1) Pravděpodobnost přežití bez úmrtí či relapsu (EFS) byla ve 3 letech pro celý soubor 35,9% (CI 95%; 18,3-53,5%), resp. 33,3% (CI 95%; 3,5-63,1%) pro selektovanou a 37,2% (CI 95%; 15,6-58,8%) pro neselektovanou skupinu. (Graf č. 2) Rozdíl mezi oběma skupinami byl v obou parametrech (OS i EFS) nesignifikantní. (Tabulka č. 6)

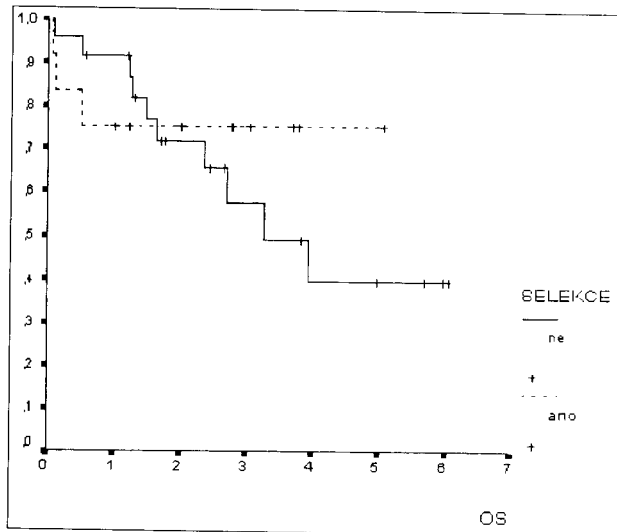
Celkově se tedy oba soubory v žádném z parametrů, tj. dosažené odpovědi, počtu i době do relapsu a úmrtí a pravděpodobnosti přežití statisticky významně nelišily.

Diskuse

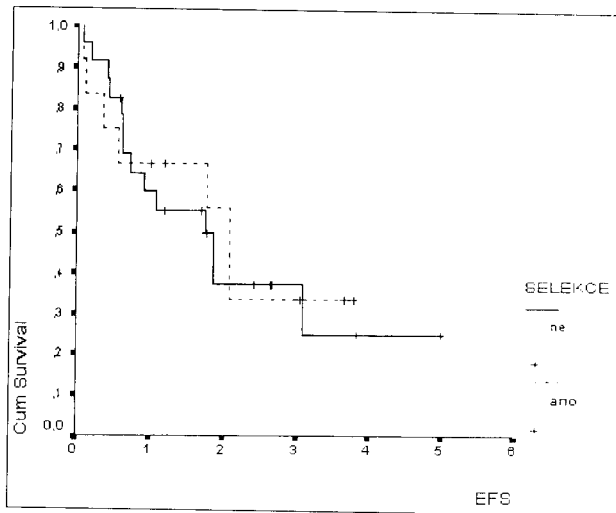
V úvodu jsme se zmínili o tom, že za jednu z možných příčin relapsů po autologních transplantacích je považována přítomnost residuálních klonogenních buněk v převáženém štěpu. (PilarSKI, 2000)

Studie zabývající se významem čištění štěpu však dosud nevyznívají jednoznačně. Řada klinických studií prokázala, že nádorová kontaminace autologních produktů je spojena s kratším DFS a naopak úspěšný ex vivo purging je spojen s lepší-

Graf č. 1. Celkové přežití (OS) ve 3 letech:



Graf č. 2. Období bez známek relapsu či úmrtí (EFS) ve 3 letech:



mi klinickými výsledky. (Fields, 1996, Sharp, 1996, Gertz, 1997). Například Gribben, 1991 a Freedman, 1996 referují o zlepšení přežití (RFS) u nemocných s folikulárním lymfomem po úspěšném čištění PBPC produktů monoklonálními protilátkami, obdobně pak Corradini, 1997 i pro lymfomy z plášťových buněk. Tyto studie vedly často k interpretaci, že nádorové buňky obsažené ve štěpu jsou zjevnou příčinou relapsu po transplantaci a tudíž pro zlepšení výsledků léčby je nezbytné čištění těchto produktů. Naproti tomu retrospektivní EBMT data (Williams, 1996) nepotvrdily rozdíly v DFS u pacientů s lymfomy transplantovaných čištěným nebo nečištěným štěpem. Přítomnost nádorových buněk ve štěpu nebo nedostatečný purging může být spíše v korelaci s rozsahem systémové residuální choroby a/nebo s chemoresistencí tumoru a tudíž reinfuse nádorových buněk jako příčina relapsu není zdaleka evidentní. Zvláštní skupinu mohou tvořit nemocní s vysoce chemosenzitivním onemocněním, nedetekovatelnou systémovou residuální chorobou a následnou vysokodávkovanou chemoterapií, u kterých pak může být relativní počet nádorových buněk obsažených v autologním štěpu determinujícím faktorem.

Na druhou stranu existují práce ukazující buď neefektivní čištění (Andersen, 1997) nebo na stejný osud nemocných ať již byli transplantováni čištěným či nečištěným štěpem (Cooper, 1998, Gupta, 1999, Lemoli, 2000, Patriarca, 2000).

V některých recentnějších pracích se však opět objevují zpra-

vy o prodloužení přežití u pacientů, u kterých bylo do vysokodávkované chemoterapie s následnou ASCT zařazeno čištění autologních produktů provázené kontinuální PCR negativitou vzorků kostní dřeně. (Freedman, 1999).

Dosud však neexistují randomizované studie, které by prokázaly zlepšení přežití (DFS) pomocí čištění. Proto i skutečný vliv nádorových buněk obsažených v autologním štetu na následný relaps onemocnění zůstává kontroverzní.

V našem souboru bylo analysováno celkem 35 pacientů s diagnosou non-Hodgkinského lymfomu různých histologických typů a pokročilosti choroby, kteří byli léčeni vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. U 12 nemocných byla provedena selekce CD 34+ buněk, kontrolní skupinu tvořilo 23 pacientů u kterých selekce provedena nebyla. Obě skupiny byly srovnatelné z hlediska pokročilosti a rozsahu onemocnění (hodnoceno pomocí IPI) v době diagnózy i v době před mobilisací a následnou ASCT. Přestože jsou naše výsledky jistě ovlivněny malým počtem pacientů ve všech srovnávaných parametrech, naše sledování spíše potvrzuje význam kvality odpovědi na léčbu a dosažení maximální eradikace residuální choroby, než roli nádorové „dekontaminace“ použitím selekce jako ex vivo purgingu převáděných krvetvorných buněk. Z hlediska srovnání míry residuální choroby před transplantací, literárně považované za jeden z nejvýznamnějších prognostických faktorů (Haas 1996, Mills, 1995) byly oba soubory porovnatelné z hlediska mezinárodního prognostického indexu (IPI), signifikantně se však lišily v počtu nemocných s prokázanou infiltrací kostní dřeně (a z toho vyplývajícím i větším zastoupením vyšších klinických stadií), která byla častěji postižena ve skupině selektovaných nemocných. Tento fakt by teoreticky mohl zvýhodňovat neselektovanou skupinu z hlediska menší kontaminace štetu maligními buňkami. Na druhé straně je však nutno vzít v úvahu, že stěžejním hodnocením postižení kostní dřeně ve většině případů nemocných bylo histologické vyšetření, jehož hladina detekce residuální nádorové populace je nízká (5×10^8 buněk). Pro relevantnější závěry budou jistě nutné širší prospektivní studie, využívající vysoce citlivé techniky genové značení, které umožní podrobnější srovnání zdroje relapsu u čištěných a nečištěných autologních štetů.

Práce, zabývající se bezpečností a kinetikou přihojení ve vztahu k selekci, většinou referují o srovnatelných charakteristikách proti neselektované skupině (Vescio, 1999, Dreger, 1999, Lemoli, 2000).

Při hodnocení parametrů přihojení jsme našli signifikantní rozdíly, když přihojení bylo statisticky významně rychlejší ve skupině neselektovaných pacientů a to jak v trombocytech, tak v leukocytech. Tato skutečnost však jednoznačně korelovala se signifikantně vyšším absolutním počtem CD 34+ buněk ve štetpích neselektovaných pacientů. Hodnoty CFU-GM byly v obou skupinách srovnatelné. Hlavním důvodem pomalejšího přihojení selektovaných nemocných zde tedy byly pravděpodobně vyšší ztráty CD 34+ progenitorů při ex vivo manipulaci. Pro celkově bezpečný absolutní počet CD 34+ buněk (medián $3,19 \times 10^6/\text{kg}$) však lze i pro selektovanou skupinu pacientů průběh hemopoetické restituce hodnotit jako rychlý a bezpečný. V námi sledovaném souboru tomu odpovídalo zjištění srovnatelně krátkého trvání období febrilní neutropenie. Rovněž peritransplantační mortalita byla srovnatelná pro obě skupiny.

Závěry

1. Při srovnání pacientů transplantovaných selektovaným a neselektovaným štetem jsme nenalezli signifikantní rozdíl v dosažení odpovědi, době do relapsu ani v parametrech přežití ve prospěch selektované skupiny.

Výsledky našeho pozorování, které je nutné brát malému počtu pacientů pouze jako předběžné, tedy význam reinfuse nádorových buněk jako příčinu relapsů a s tím související nutnosti čištění autologních štetů zpochybňují. Pro jednoznačější zodpovězení této otázky by byly nutné širší randomizované studie.

2. Pomalejší kinetika přihojení, kterou jsme pozorovali ve skupině selektovaných pacientů, byla pravděpodobně důsledkem nižšího počtu CD 34+ prekursorů u selektovaných nemocných v důsledku jejich ztrát při zpracování a manipulaci. Vzhledem k jejich dostatečnému absolutnímu počtu se však neprojevila větším počtem komplikací.

Práce byla podporována grantem: IGA MZ ČR 4822-3

Literatura:

- Andersen NS, Donovan JW, Borus JS et al., Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma and polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 1997; 90: 4212-21
- Brenner MK, Rill DR, Moen RC et al., Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-6
- Civin CI, Trischmann T, Kadan NS et al., Highly purified CD 34-positive cells reconstitution hematopoiesis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2224-33
- Cooper WC, Moss TJ, Ross AA et al., Occult tumor contamination of hematopoietic stem cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3509-17
- Corradini P, Astolfi M, Cherasco C et al., Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphoma treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89: 724-31
- Dreger P, Viehmann K, von Neuhoff et al., Autografting of highly purified blood progenitor cells following myeloablative therapy in patients with lymphoma: a prospective study of the long-term effects on tumor eradication, reconstitution of hematopoiesis and immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 153-61
- Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL et al., Clinical significance of bone marrow metastasis in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868-76
- Freedman AS, Gribben JG, Neuberg D et al., High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996; 88: 2780-6
- Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al., Long-term follow-up of autologous bone marrow transplant patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3325-33
- Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA et al., Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 337-42
- Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D et al., Immunologic purging of marrow by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *A Engl J Med* 1991; 325: 1525-33
- Gupta D, Bybee A, Cooke F et al., CD 34+ selected peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with multiple myeloma: tumor cell contamination and outcome. *Br J Haematol* 1999; 104: 166-77
- Haas R, Moos M, Mohle R et al., High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 149-155
- Horowitz MM, Rowlings PA, An update from the International Bone Marrow Transplant Registry and Autologous Blood and Marrow Transplant Registry on current activity in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 395-400
- Hrubá A, Skala JP, Matějčková S et al., Čištění hematopoetických krvetvorných buněk u autologních transplantací. *Čas Lek Česk* 1997; 4: 395-400
- Champlin R, Khouiri I, Kornblau S et al., Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 87-95
- Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E et al., Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD 34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000; 95: 2234-9
- Majumdar MY, Korner JJ, Hildebrandt M, et al., Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis products in breast cancer patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 1997; 89: 337-44.
- Mills W, Chopra R, Mc Millan A et al., BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 588-93

20. Patriarca F, Damiani D, Fanin R et al., High-dose therapy in multiple myeloma: effect of positive selection of CD 34+ peripheral blood stem cells on hematologic engraftment and clinical outcome, *Haematologica* 2000; 85: 269-74
21. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K et al., Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice, *Blood* 2000; 95: 1056-65
22. Prince HM, Imrie K, Crump M et al., The role of intensive therapy and autologous blood and marrow transplantation for chemotherapy-sensitive relapsed and primary refractory non-Hodgkin's lymphoma: identification of major prognostic groups, *Br.J Haematol* 1996; 92: 880-889
23. Rill DR, Santana VM, Roberts WM et al., Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells, *Blood* 1994; 84: 380-3
24. Sharp JG, Kessinger A, Mann S et al., Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest, *J Clin Oncol* 1996; 14: 214-9
25. Shipp et al., *New England Journal of Medicine* 1993; 329: 987-994
26. Trněný M, Slabý J, Benešová K et al., Intenzifikace vysokodávkované chemoterapie BEAM s autologní transplantací periferních krevních buněk u nemocných s nehodgkinským maligním lymfomem, *Hematologia a Transfuziologia* 1998
27. Vescio R, Schiller G, Stewart AK et al., Multicenter phase III trial to evaluate CD 34+ selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma, *Blood* 1999; 93: 1858-68
28. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM et al., Purging of bone marrow in autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry, *J Clin Oncol* 1996; 14: 2454-64