

VYDÁVÁ
ČESKÁ
LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ

V NAKLADATELSTVÍ
ApS BRNO, spol. s r. o.

REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

Tiskne Moravská typografie, a. s.
Brno, Moravské náměstí 13

Vychází 6krát ročně
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

F 5158 Mič 46-772
ISSN 0862-495 X

INTERNET – vstupní adresa:
<http://www.linkos.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLEČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

BEDNAŘÍK OTAKAR HÁJEK ROMAN
MAYER JIŘÍ KOCÁK IVO
ČOUPEK PETR ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno	KOZA IVAN, Bratislava
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava	LAGINOVÁ VIERA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno	MAYER JIŘÍ, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava	MECHL ZDENĚK, Brno
BILDER JOSEF, Brno	NĚMEC JAROSLAV, Brno
ČOUPEK PETR, Brno	ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
DRBAL JOSEF, Brno	PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť	PLEŠKO IVAN, Bratislava
FAIT VUK, Brno	PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
HÁJEK ROMAN, Brno	REJTHAR ALEŠ, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava	SIRACKÝ JÁN, Bratislava
KALLAY JOZEF, Bratislava	SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava	UJHÁZY VILIAM, Bratislava
KLASTERSKÝ JAN, Brusel	VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
KLENER PAVEL, Praha	VYZULA ROSTISLAV, Brno
KOCÁK IVO, Brno	WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
KOUTECKÝ JOSEF, Praha	ŽALOUĐÍK JAN, Brno
KOVARÍK JAN, Brno	

Přehled

Hájek R., Křivanová A., Bourková L., Doubek M., Fišerová A., Kovářová L., Musilová R., Büchler T., Penka M., Vorlíček J.
Biologie dendritických buněk a jejich příprava pro klinické užití (přehled a předběžné výsledky) 79

Papajík T., Raida L., Indrák K.
Význam prognostických faktorů při volbě optimální léčebné strategie u non-hodgkinských lymfomů 85

Původní práce

Mayer J., Vášová I., Kořístek Z., Navrátil M., Klabusay M., Doubek M., Vodvářka P., Petráková K., Vorlíček J., Černilová I.
Záchraně a periferní kmenové buňky mobilizující chemoterapie založená na kombinaci ifosfamidů a etoposidu u nemocných lymfomem se špatnou prognózou 90

Pytlík R., Beneš P., Gregora E., Pařoková M., Chocenská E., Procházka B., Kozák T.
Hodnocení mukositivity u pacientů léčených vysokodávkovanou chemoterapií s podporou autologních krvetvorných buněk a jeho význam pro odhad perorálního příjmu a dalších faktorů morbidity a mortality 96

Papajík T., Vondráková J., Raida L., Urbanová R., Faber E., Hubáček J., Heczko M., Sulovská I., Kriegová E., Jarošová M., Indrák K.
Stanovení vybraných prognostických faktorů u nemocných s non-hodgkinskými lymfomy 102

Zprávy

Světová konference o melanomu 28. 2.–3. 3. 2001. Benátky 106

Informace

– knihy 84

Onkologické společnosti 108

CONTENTS**Reviews**

Hájek R., Křivanová A., Bourková L., Doubek M., Fišerová A., Kovářová L., Musilová R., Büchler T., Penka M., Vorlíček J.
Dendritic Cell Biology and Preparation for Clinical Applications (Review and Preliminary Results) 79

Papajík T., Raida L., Indrák K.
Importance of Prognostic Factors in a Choice of Optimal Therapeutical Strategy in Patients with Non-Hodgkin's Lymphomas 85

Original Publication

Mayer J., Vášová I., Kořístek Z., Navrátil M., Klabusay M., Doubek M., Vodvářka P., Petráková K., Vorlíček J., Černilová I.
Iphosphamide and Etoposide Based Chemotherapy as Salvage and Mobilizing Regimens for Poor Prognosis Lymphoma 90

Pytlík R., Beneš P., Gregora E., Pařoková M., Chocenská E., Procházka B., Kozák T.
The evaluation of mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy with Autologous stem cell support and its role in evaluation of oral intake and other factors of morbidity and mortality 96

Papajík T., Vondráková J., Raida L., Urbanová R., Faber E., Hubáček J., Heczko M., Sulovská I., Kriegová E., Jarošová M., Indrák K.
Assessment of Selected Prognostic Factors in Patients with Non-Hodgkin's Lymphomas 102

Report

Fifth World Conference on Melanoma, 28. 2.–3. 3. 2001 106

Notification

– book 84

Onkological Associations 108

BIOLOGIE DENDRITICKÝCH BUNĚK A JEJICH PŘÍPRAVA PRO KLINICKÉ UŽITÍ (PŘEHLED A PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY)

DENDRITIC CELL BIOLOGY AND PREPARATION FOR CLINICAL APPLICATIONS (REVIEW AND PRELIMINARY RESULTS)

^{1,2}HÁJEK R., ¹KRIVANOVÁ A., ²BOURKOVÁ L., ¹DOUBEK M., ²FÍŠEROVÁ A., ¹KOVÁŘOVÁ L., ²MUSILOVÁ R., ¹BÜCHLER T., ²PENKA M., ¹VORLÍČEK J.

¹INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

²ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

Souhrn: Dendritické buňky (DB) jsou buňky předcházející antigen, které jsou silnými stimulatory imunitní odpovědi B i T lymfocytů. Ačkoliv jsou DB normálně přítomny v cirkulaci ve velmi malých počtech, jsme dnes schopni je namnožit v buněčných kulturách. DB mohou být in vitro získány z různých zdrojů jako je kostní dřeň, pupečnicková a periferní krev. Většina protokolů používá ke kultivaci DB cytokiny GM-CSF, IL-4 a TNF-alpha. Přidání dalších růstových faktorů jako je SCF a Flt-3 ligand a CD 40 může jejich počet ještě zvýšit. DB lze získat v různých stádiích zralosti v závislosti na době kultivace kultury. Pro klinické užití mohou být DB množeny v bezsérových médiích a pro budoucí využití zamrazeny. V prvních experimentech jsme použili dvoukrokovou metodu kultivace DB z CD34+ buněk s dosažením 15násobné expanze DB během 12denní kultivace. Imunoterapie založená na využití dendritických buněk je středem zájmu v léčbě různých nádorových onemocnění a zafandila se mezi nejperspektivnější a nejintenzivněji zkoušené experimentální léčebné postupy v onkologii.

Klíčová slova: Dendritické buňky - Vakcinace - Imunoterapie

Summary: Dendritic cells (DCs) are extremely efficient antigen-presenting cells that are potent stimulators of both B and T cell immune responses. Although DCs are normally present in extremely small numbers in the circulation, recent advances in DC biology have made it possible to generate DCs in culture. DCs can be generated in vitro from various cellular sources including bone marrow, cord blood and peripheral blood. Although culture conditions are extremely diverse, the majority of protocols grow DCs in GM-CSF and either TNF-alpha and/or IL-4. The addition of other growth factors such as SCF and Flt-3 ligand and CD 40 can dramatically enhance DC recovery. Thus, DC at different stages of maturation, based on phenotype and capacity to capture antigen, can be obtained depending on culture conditions. For clinical applications, DCs can be generated in serum-free media and cryopreserved for future clinical applications. In our first experiments two-stage culture system was used for CD34+ precursors and 15-fold increase in DC yield was observed after 12 days of cultivation. The ability to obtain DCs in numbers suitable for manipulating immune responses has pushed DC-based immunotherapies into the spotlight for treatment of various malignancies. Today is dendritic cell vaccination strategy one of the most frequent experimental therapies evaluated in the clinical setting, with promising results.

Key words: Dendritic Cells - Vaccination - Immunotherapy

Úvod

Studie zkoumající roli buněčné imunity v protinádorovém účinku se soustřeďují na rozpoznávání nádorových antigenů T-buňkami (1). Nádorová imunita a aktivace cytotoxických T-lymfocytů (CTL) úzce souvisí s prezentací nádorového antigenu ve spojení s antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (HLA). Aktivace CTL vyžaduje spolupráci mezi několika elementy intaktního imunitního systému. Zásadní roli v protinádorové imunitní odpovědi mají buňky předkládající antigen a efektorové buňky (CD4+ a CD8+ T- buňky). Dendritické buňky (DB) jsou unikátní podskupinou buněk předkládajících antigen, které hrají důležitou roli v rozvoji protinádorové buněčné odpovědi. DB jsou extrémně výkonné v zachycení, zpracování a předkládání antigenů T buňkám (2). Možnost získání velkého množství DB „ex vivo“ (3,4), zvýšila zájem o imunoterapeutické postupy založené na jejich užití v léčbě řady nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že DB mohou být derivovány jak z proliferujících tak neproliferujících prekurzorů v kulturách, užitím kombinace granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) s IL-4

v kombinaci s TNF alfa či bez něj (3,4). Přidání dalších cytokinů jako například Flt-3 ligandu, CD 40 a SCF může značně zvýšit počet DB množných in vitro (5). Dva odlišné prekurzory DB dávají vznik myeloidním nebo lymfoidním DB, které mají různou schopnost kontroly diferenciaci pomocných T-buněk (6).

V tomto článku diskutujeme obecné charakteristiky DB a následně metody jejich kultivace a expanze ex vivo z různých buněčných zdrojů pro užití v klinických studiích.

V současnosti je využití DB v léčbě různých nádorových onemocnění ověřováno řadou klinických studií u různých nádorových onemocnění. Preklinické výsledky i první výsledky klinických studií byly natolik povzbudivé, že zařadily tento typ experimentální terapie mezi nejperspektivnější postupy současnosti. Použití vakcín připravených z dendritických buněk je výjimečné i svojí obecnou použitelností pro všechna nádorová onemocnění, neboť jde o stimulaci vlastního imunitního systému organismu s cílem „naučit efektorové imunitní buňky rozpoznat nádor“. Podmínkou je přítomnost nádorového antigenu, což je v řadě případů limitací použití dendritických

buněk. Optimální nádorový antigen a jeho získání se staly velkým výzkumným tématem současnosti.

Charakteristika dendritických buněk

DB byly poprvé popsány Langerhansem v r. 1868. V roce 1973 je identifikoval Steinman jako slabě adhezní buněčnou populaci v myši slezině (7). Lidské intersticiální DB byly popsány později v r. 1981 (8). V lidské kostní dřeni byla identifikována malá fenotypicky odlišná podskupina hematopoetických progenitorů (CD34, Lin-, CD45RA, CD38, Thy-1, c-kit-), ze kterých vznikají T- buňky, B- buňky, NK buňky a DB. nedávají však vznik myeloidním a erytroidním buňkám (9). DB sídlí v lymfatických i nelymfatických tkáních a odlišují se funkcí i fenotypem v závislosti na stadiu jejich aktivace (10, 11, 12). Poznání, že jsou DB extrémně výkonné v prezentaci antigenů nezadaným T- buňkám, je zařadilo do centra zájmu jako významný typ antigen prezentujících buněk, jež jsou schopny vést k vyvolání tumor-antigen specifické cytotoxické odpovědi T- buněk. Ačkoliv jsou DB velice rozmanité v závislosti na stadiu jejich diferenciaci a aktivace, mají některé vlastnosti společné: a) schopnost stimulovat odpověď primárních T- buněk, b) spontánní a rychlé shlukování s T- buňkami, c) buněčný pohyb a schopnost migrace do míst výskytu T- buněk včetně lymfatických tkání (12), d) fagocytární aktivitu a navázání na antigeny pomocí receptorů a makropinocytózy (13), e) fenotyp odlišný od ostatních buněčných typů. Například kultivované dendritické buňky (aktivované a diferencované) neexprimují klasické markery T- buněk, B- buněk či monocytů a makrofágů (14), ale mají DB specifické molekuly (CMRF-44, CMRF-56, CD83, S100), stimulační molekuly (CD40, CD80, CD86), adhezní molekuly (CD11a, CD11c, CD44, CD50, CD54, CD58, CD102), společné leukocytární antigeny (CD45RA, CD45RO), HLA antigeny (HLA-ABC, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) a aktivací markery jako je CD 25. DB jsou dále odlišné od monocytů a makrofágů, jelikož nemají myeloperoxidasovou aktivitu a mají jen nízkou expresi 5-nukleotidázy, dipeptidyl-peptidázy, CD 26 a cathepsin B aktivity. Ačkoliv byly DB pojmenovány podle jejich zvláštní morfologie, není tato dostatečná k jejich odlišení od ostatních buněk jako jsou B- buňky a fibroblasty, které mohou vypadat velmi podobně (11).

Aktivační stav a migrační kapacita in vivo jsou základními vlastnostmi DB, které musí být zohledněny při zlepšování protinádorových vakcín a imunoterapeutických protokolů užívajících DB. DB progenitory vznikají v kostní dřeni a krevní cestou se dostávají do různých nelymfatických tkání, jako jsou například epidermis či plíce. DB migrují do jednotlivých tkání a v cirkulaci jsou přítomny v extrémně malých množstvích (0,1 % všech mononukleárních buněk periferní krve). DB izolované z krve a nelymfatických tkání jsou nazývány „nezralými“ a jsou velmi výkonné v zachycení a zpracování antigenů (15). Zánětlivé mediátory jako je TNFalfa, IL-1 a LPS indukují vyzrávání DB a jejich migraci do míst výskytu T- buněk (parakortikální oblasti) sekundárních lymfatických tkání (16). Vyzrávání DB vede ke snížení schopnosti endocytózy antigenů a naopak zvyšuje množství adhezních a aktivujících molekul, potřebných k prezentaci peptid-HLA komplexů T buňkám (17). Pro účinnost DB je důležité to, zda si ponechají in vitro expandované DB schopnost migrace a schopnost nalezení místa výskytu T- buněk po zpětném přenosu do organismu. Nedávná studie Barratova-Boyesova a spol. zkoumala migrační kapacitu in vitro množených DB po adoptivním přenosu na šimpanzovi (18). Objevíli, že fluorescenčně značené DB migrovaly po podkožní injekci do míst výskytu T- buněk v lymfatických uzlinách. V parafolikulárních zónách obklopujících folikuly B- buněk zůstávaly DB po dobu 5 dnů a vyvolaly expresi velkého počtu molekul CD86, CD40 a HLA II. třídy. Naopak nebylo možno pozorovat DB v lymfatických uzlinách po intravenózní injekci (18). Tato data společně s výsledky pozorování

užívajících myši modely (19, 20) dokazují, že cesta podání hraje zásadní roli v usídlování in vitro množených DB.

Kultivace dendritických buněk in vitro

Byla popsána řada protokolů kultivace lidských DB in vitro, užívajících různé buněčné zdroje jako například kostní dřeň (21, 22, 23), pupečnickovou krev (22, 24, 25), periferní progenitorové (kmenové) buňky (26 - 30) a mononukleární buňky periferní krve (3, 4, 31 - 33). Z CD 34 + progenitorových buněk vznikají dva různé typy DB prekurzorů lišící se expresí CD1 a CD14. CD1a +, CD 14- podtyp se diferencují v kulturách do epidermálních DB, zatímco CD1a-, CD14 + podtyp produkuje makrofágy nebo intersticiálně-dermální DB, což závisí na stimulačních podmínkách (10, 34). Lidské CD14 + monocytů mohou být také užity jako výchozí populace a diferencují se v DB za příslušných stimulačních podmínek (34). Jak je patrné z tabulky 1, byly popsány různé protokoly kultivace DB za různých stimulačních podmínek užívajících buňky získané z anatomicky různých tkání.

Tab. 1. Podmínky pro kultivaci dendritických buněk z různých buněčných zdrojů

Buněčný zdroj	Podmínky kultivace	Medium/Aditivum	Reference
Kostní dřeň	SCF, GM-CSF, TNF α SCF, GM-CSF, TNF α	IMDM IMDM/20% FTS	Saraya et al ²² Szabolet et al ²³
Pupečnicková krev	SCF, GM-CSF, TNF α	IMDM	Saraya et al ²²
PRSC	GM-CSF, TNF α SCF, GM-CSF, IL-4, IL-3, IL-6	RPMI/10% FTS RPMI/10% FTS	Bernhard et al ²⁶ Herbst et al ²⁷
MBPK	GM-CSF, IL-4 GM-CSF, IL-4, TNF α GM-CSF, IL-4, MCM	RPMI/10% FCS RPMI/10% FCS RPMI/1% plasma	Sallusto et al ¹³ Zhou et al ¹⁶ Bender et al ¹

PRSC-periferní kmenové buňky; MBPK-mononukleární buňky periferní krve
IMDM, RPMI - kultivační média

Také podmínky kultivace DB se značně různí, růstový faktor GM-CSF se však jeví pro expanzi dendritických buněk jako nutný, bez ohledu na typ výchozí buněčné populace. GM-CSF indukuje expanzi DB progenitorů (35), jejich diferenciaci a přežití po dobu delší než šest týdnů (32). Ke kultivaci DB je společně s GM-CSF užíván často IL-4, obzvláště když jsou buněčným zdrojem neadherentní mononukleární buňky a monocytů periferní krve. IL-4 inhibuje růst populace makrofágů a indukuje růst a vyzrávání DB (35).

Jestliže je užito kostní dřene či pupečnickové krve (CD34+ progenitorové buňky), je ke kultivaci DB společně s GM-CSF namísto IL-4 užíván často i TNFalfa (30, 35, 36). TNFalfa pravděpodobně působí redukcí granulocytární produkce a zvyšuje expresi beta řetězců receptoru GM-CSF na progenitorových buňkách, čímž zvyšuje jejich odpověď na cytokiny (25, 37). Chen a spol. zkoumali roli TNF alfa v kultivaci DB z periferní krve v bezsérových médiích a objevili, že přidání TNF alfa ke kulturám v 7. dni vede ke zdvojnásobení populace DB a znatelně tak zvyšuje kapacitu buněk prezentujících solubilní antigeny T- buňkám (38).

Z dalších cytokinů je užíváno kombinace IL-3 a TNF alfa (24), CD40 ligand (CD40L) (39), IL-13 (28), stem cell faktor (SCF) (23, 40), TGF beta (41), Flt-3 ligand (42). Užití kontinuálního průtokového perfuzního systému ještě dále zvyšuje expanzi DB z CD 34 + buněk při kultivaci s výše uvedenými cytokiny (43). K urychlení diferenciaci DB je užíván IL-10. Tato skutečnost může být důležitá v léčbě autoimunitních a alergických onemocnění (44). Jiná strategie kultivace DB zahrnuje stupňový systém, který dovoluje buňky vystavovat působení různých cytokinů v různých časových obdobích během kultivace. Ye a spol. kultivovali CD34+ buňky kostní dřene po dobu 5 dnů s GM-CSF, SCF a TNFalfa a následně s výměnou CD40L za TNFalfa po dobu dalších 5 dnů ke zvýšení počtu DB (45).

Výchozí populace, výběr cytokinů a podmínky kultivace značně ovlivňují počet, fenotyp a funkci DB. Vzhledem k rozdílu ve schopnosti endocytózy, zpracování a prezentaci antigenu, závislé na stupni jejich diferenciaci, jsou DB extrémně heterogenní skupinou. Tato skutečnost hraje velmi významnou roli v užití DB jako imunoterapie u pacientu s nádorovým onemocněním. Navíc byla nedávnými studiemi zjištěna existence dvou různých podtypů DB, které se liší schopností různé stimulace pomocných T-lymfocytů v imunitní odpovědi (6). Jeden podtyp je derivován z monocytů periferní krve a vede k vyžrávání myeloidních DB (nazývaných DB1), za přítomnosti GM-CSF a IL-4 (17). Druhý podtyp je derivován z plasmocytoidních buněk CD4+, CD3- a CD11c-krve či buněk tonsilárních a pokud je kultivován s IL-3 dává vznik lymfoidním DB (označovaným jako DB2) (15). DB1 indukují diferenciaci T-pomocných lymfocytů (CD4+), které se diferencují v subpopulaci TH 1 buněk, zatímco DB2 mohou indukovat diferenciaci v buňky TH 2 (6). Toto může vést ke zcela odlišné odpovědi na antigen.

Zralé či terminálně diferencované DB mají velkou stimulační aktivitu a jsou nejsilnějšími induktory odpovědi nezadaných T-buněk (4, 11). Zralé DB mohou být identifikovány fenotypicky díky expresi CD83 antigenu (4, 11). Jak TNFalfa tak LPS či CD40L mohou být užity k indukci diferenciaci DB při použití mononukleárních buněk periferní krve kultivovaných s GM-CSF a IL4 v mediích obsahujících 10 % fetálního telecího séra (FTS) (46). CD40 hraje také pravděpodobně zásadní roli ve vyžrávání DB in situ, jelikož interakce s CD40 vede k produkci vysokých hladin IL-12 dendritickými buňkami a zvyšuje tak stimulační aktivitu T-buněk (47). Tyto skutečnosti ukazují, že optimální vyžrávání DB je složitý proces zahrnující množství růstových faktorů s vzájemnými složitými vazbami, které doposud neznáme.

Kultivace dendritických buněk pro klinické užití

Buněčné zdroje a výtěžek DB: Periferní krev může být odebrána v dosti velkém množství k získání dostatečného počtu DC pro klinické užití. Jelikož je však počet DB prekurzorů v periferní krvi relativně velmi malý (36), byla vyvinuta řada procedur pozitivní či negativní selekce, které zvyšují počet CD34+, CD34- nebo CD14+ DB prekurzorů před in vitro stimulací, využívajících rozdílných densních gradientů (12). Alternativní cestou je přímá izolace prekurzorových buněk pozitivní selekcí za použití protilátek, které rozpoznávají antigen CD34 či CD 14. Pozitivní selekce CD34 buněk byla užita i při získávání DB ze vzorků kostní dřeně. Bohužel jsou tyto techniky velice pracné a nákladné pro klinické využití. Výtěžek DB z mononukleárních buněk periferní krve může být zvýšen šest až třicetkrát při užití G-CSF nebo Flt-3 ligandu (4, 5). Produkty leukaferezy z pacientů po protinádorové léčbě obsahují více CD34+ buněk a mohou být tedy užity k získání většího počtu DB v kultuře (mobilizované mononukleární buňky periferní krve - MBPK - tab.2).

Zjednodušený způsob navýšení DB prekurzorů zahrnuje selekci adhezujících buněk odstraněním neadhezujících buněk po

Tab. 2. Výnos dendritických buněk z prekurzorů periferní krve a kostní dřeně

Buněčný zdroj	Množství výchozího materiálu	Množství DB	Poměr DB k výchozím buňkám	Reference
MBPK (E-rosette neg)	40 ml. krve	1,5 - 3,8 x 10 ⁶	74 - 96%	Bender et al ¹
MBPK (CD3 ⁺ , DR ⁺)	40 ml. krve	4 - 8 x 10 ⁶	60 - 80%	Romani ³⁵
MBPK (CD2 ⁺ , CD19 ⁻)	40 ml. krve	0,8 - 3,3 x 10 ⁶	30 - 80%	Romani ³
MBPK (CD14 ⁺)	100 ml. krve	1,2 - 1,5 x 10 ⁷	70%	Herbst et al ²⁷
Mobilizované MBPK (leukafereza)	2 x 10 ⁵ CD34+	8 x 10 ⁶	40-x vyšší	Siena et al ³⁶
Kostní dřeň (CD34 ⁺)	1 ml.	1,7 x 10 ⁶	75 x vyšší	Szabolet et al ²⁵

MBPK - mononukleární buňky periferní krve

Tab. 3. Výsledky kultivace dendritických buněk u nemocných s mnohočetným myelomem s využitím autologního štěpu jako zdroje DB

Parametr	hod +2	den +7	den +12
CD 11 c	55,7 (51,2-58)	31,9 (30,4-32,7)	67,7 (59,4-73,6)
CD 50+	88,2 (84,2-96,4)	73,7 (66,2-83,7)	69,0 (51,6-85,6)
CD 54+	17,6 (14,2-19,3)	44,4 (32,3-66,3)	74,6 (66,9-86,2)
CD 80+	2,5 (2,1-3,2)	27,1 (22,3-33,7)	64,4 (51,0-83,5)
CD 86+	4,7 (3,9-5,2)	28,4 (25,9-29,8)	63,9 (47,7-86,2)
CD 83+	3,7 (2,6-4,3)	27,0 (26,7-27,4)	61,2 (48,7-79,2)
HLA DR+	36,0 (21,8-43,1)	56,3 (28,0-72,0)	71,5 (69,8-73,8)

Přibližné hodnocení expanze a aktivace DB (průměry ze 3 pokusu)

dvou hodinách kultivace. Kultivaci adhezujících buněk v GM-CSF a IL-4 může být získáno 3-8x10⁶ DB ze 40 ml krve (35). Tato metoda je jednoduchá svým provedením a může být užita k získání velkého množství DB, problémem je jen obtížnost standardizace odstranění neadhezujících buněk a také kontaminace lymfocyty. Dle našich zkušeností je tato metoda získání DB buněk z PBSC dostatečná k získání adekvátního počtu DB pro klinické studie.

Výběr media: k růstu lidských DB byla zkoušena různá media jako např. RPMI-1640, AIM-V, X-VIVO 10/15/20, Hybricare a Iscovo. Bylo testováno i lidské sérum a plasma namísto fetálního telecího séra (FTS) pro vyloučení možnosti prezentace xenogenních antigenů DB. I když media X-VIVO 20 a AIM-V s obsahem 1 % autologní plasmy mohou být užita ke vzniku a vyžrávání DB z periferní krve, užití RPMI-1640 vede k získání většího množství DB (3, 4). Největší výnos DB byl získán použitím RPMI-1640 s dodatkem 10 % FTS. Kultivace DB v neséroových mediích je dostatečná, i když přidání FTS vede k výnosu většímu (3). Pokud je to možné, měly by být v klinických studiích zvířecí séra při kultivaci DB vynechána, abychom předešli nechtěným imunitním reakcím proti cizorodým proteinům.

Zamrazení DB a jejich prekurzorů: DB mohou být získány z mononukleárních buněk periferní krve v dimethyl sulfoxidu (DMSO) obsahujícím buď humánní sérový albumin nebo FTS (4, 48). Stimulovaná krev obohacená o CD34+ buňky i mononukleární buňky izolované z plné krve (rutinní odběr krve) mohou být zmrazeny a později užity ke kultivaci DB. Makino a Baba srovnávali užití rozmrazených a čerstvých mononukleárních buněk periferní krve od stejných dárců, výsledky byly podobné (4, 48). Optimální je zřejmě zamrazení prekurzorů DB s 12 % dimethylsulfoxidem obsahujícím 2-30 % FTS (48). Přestože jsou DB velmi citlivé ke zmrazovacím a rozpouštěcím procedurám, dochází při nich k minimální ztrátě normální životaschopnosti buněk, která je větší než 90 % (48).

Presentace antigenu a aktivace lymfocytů T: Jak jsme se již zmínili, nezralé DB jsou extrémně výkonné v zachycení antigenů různými mechanismy zahrnujícími fagocytózu částic a mikrobů, extracelulární makropinocytózu, a receptory řízenou endocytózu zahrnující lektin a Fc receptor imunoglobulinu (13). Nezralé DB jsou bohaté na endosomální struktury obsahující velké množství molekul HLA třídy II, které vážou adekvátní peptidy. Tyto komplexy se pak dostávají na buněčnou membránu, kde zůstávají několik dnů. Odhaduje se, že jen několik stovek těchto komplexů v milionu povrchových molekul na DB je schopno vyvolat odpověď T-buněk (49). Nezralé DB potřebují pravděpodobně jen velmi krátkou expozici antigenu in vitro, aby byly schopny stimulace antigen-specifické T-buněčné odpovědi. Tento fakt je také podporován studiemi zkoumajícími zachycení FITC-značených IgG a IgA idiotypových (Id) proteinů dendritickými buňkami, jejichž výsledky ukazují, že DB jsou schopny zachycení přibližně 2x10⁵ molekul Id-proteinů v jedné hodině (*Butch a spol., nepublikovaná data*). Studie prováděné na myších modelech

ukazují, že *in vivo* nádorem aktivovaná imunitní odpověď může být vyvolána smísením DB s peptidy, lysáty nádorových buněk nebo izolovanými částmi membrán (11). Nádorově specifické cytotoxické T-buněčné odpovědi byly vyvolány také prostým přenosem DB na myši nemocné nádorem, i když výraznější odpověď byla pozorována při přenosu DB po aktivaci nádorovými antigeny (49). Zitvogel a spol. demonstrovali, že DB secernují antigen prezentující měchýřky, nazývané exosomy, které jsou derivovány z endosomů obsahujících antigenní peptidy vázané na molekuly (glykoproteiny) HLA I a II. Adoptivní transfer exosomů izolovaných z kultur DB indukovaných nádorovými peptidy vedl ke kompletní regresi či redukci růstu několika myších tumorů *in vivo* (50).

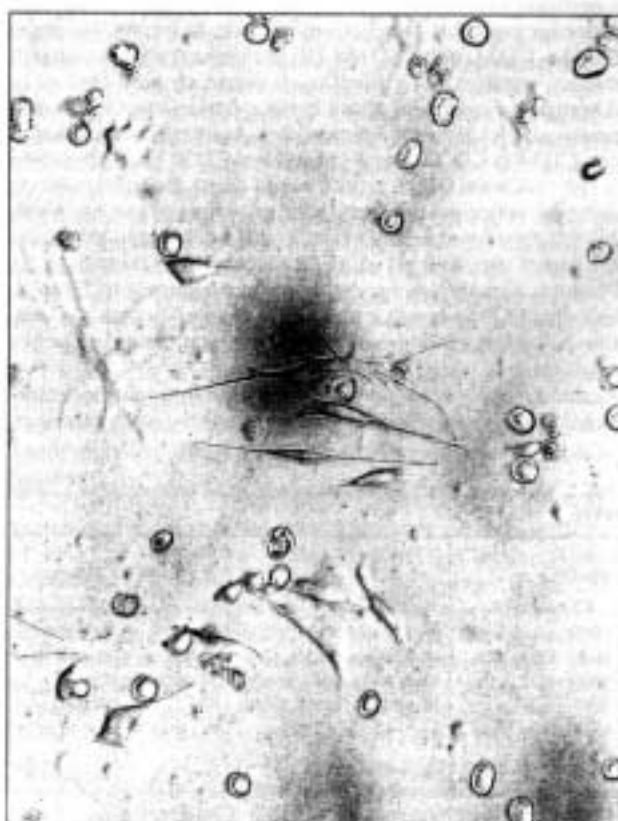
DB vakcinace: Optimální cesta podání dendritických buněk s antigenním materiálem pacientům s nádorovým onemocněním je stále nejasná. Cílem je podání DB do těla cestou, která dovolí jejich usídlení v místě nádorových buněk. Optimální cesta podání může být závislá i na typu nádorového onemocnění. Pro solidní tumory je patrně nejvýhodnější vakcinace podkožní cestou, jak ukazuje nedávná studie demonstrující, že po podkožní aplikaci DB šimpanzům jsou tyto lokalizovány v regionálních lymfatických uzlinách (18). Stejně nejasná je optimální cesta pro metastatický proces a hematologické malignity. V současnosti je pro hematologické malignity užívána k podání DB cesta intravenózní a subkutánní (51). Jiná skutečnost, která může mít vliv na lokalizaci DB *in vivo*, je exprese různých povrchových molekul ovlivňujících tkáňové interakce, jako například integrinů, ICAM1, ICAM2, CD31, CD44 a CD68 (11).

Také nezbytný počet DB, které mají být podány, aby vyvolaly potřebnou odpověď T-buněk *in vivo* je nejasný. Ve smíšených lymfocytárních kulturách mohou DB vyvolávat proliferaci alogenních T-buněk ve velmi malém poměru (2). V klinických studiích opakovaně zvyšující se dávky DB z 1×10^6 do 3×10^7 podávané intravenózně, subkutánně nebo přímo do nepozižených lymfatických uzlin, nevyvolávaly žádné nežádoucí účinky (51).

Dalším důležitým faktorem při užívání vakcinačních protokolů je, že interakce mezi DB a T-buňkami jsou obousměrné a mohou být ovlivňovány faktory mikroprostředí, ve kterém se buňky setkávají. Bylo pozorováno, že DB z různých tkání indukují T-buňky produkující různé cytokiny, které mohou vést k odlišnostem ve vyžívání DB. Byla prokázána produkce IL-12 dendritickými buňkami, cytokinu, který je důležitý pro vznik pomocných T-lymfocytů a následnou produkci Th1 cytokinů, jako například IFN gama. V závislosti na podmínkách mikroprostředí tak mohou DB stimulovat určité subtypy T-buněk, sloužící k různým typům imunitní odpovědi, pravděpodobně včetně vzniku tolerance (52).

Vlastní zkušenosti s kultivací a přípravou dendritických buněk jsou limitované a jsou založeny na spolupráci s výzkumníky s Little Rocku (53). Příprava protokolu pro klinické použití u mnohočetného myelomu je ve fázi preklinických experimentů probíhajících ve spolupráci Oddělení klinické hematologie a Interní hematologické kliniky FN Brno. Ve vstupních experimentech jsme použili část autologního štěpu po stimulaci G-CSF, který byl po rozmražení a promytí kultivován podle základního dvoukrokového systému kultur (GM-CSF + IL4 + Flt3 den 1-6; GM-CSF + TNF alfa den 7-12) s následným morfologickým a flowcytometrickým hodnocením. Vývoj sledovaných znaků ze tří reprezentativních pokusů je obsahem tabulky. Velikost výchozí buněčné populace CD 34+ byla přibližně $97,5 \times 10^6$ CD34+/ml. Koncentrace použitých cytokinů byly následující: GM-CSF 800 U/ml, IL-4 50 ng/ml, TNF-alfa 40 ng/ml a FLT 3 25 ng/ml. Expanze DB (15x) byla hodnocena pomocí specifického znaku CD83+ [z 3,7 % (2,6 - 4,3 %) na 61 % (48,2 - 79,2 %)], s korelujícím vzestupem dalších znaků: antigenů HLA-DR, markerů kostimulačních molekul (CD80, CD86) a adhezivních molekul (CD54, CD11c). Na obrázku 1 jsou zralé DB charakteristické morfologie (zvětšení 200x). Tyto experimenty ověřili možnosti a podmínky kultivace a expanze DB v našich laboratorních podmínkách. Preklinické testování pokračuje. Cílem

Obr. 1. Zralé dendritické buňky s charakteristickou morfologií (zvětšení 200x)



je příprava klinického protokolu s podáním DB nemocným s mnohočetným myelomem (54).

Závěr

Z našich znalostí o DB vyplývá, že se jedná o extrémně různorodé buňky. Pro klinické užití lze DB získat z různých zdrojů zahrnujících kostní dřeň, pupečnickovou a periferní krev. Ke kultivaci je užíváno řady cytokinů a růstových faktorů, které mohou významně zvýšit výsledný počet DB. Jejich podání zesiluje T-buněčnou odpověď proti různým patogenům a především nádorovým antigenům. Využití DB ve formě vakcín je novou možností při léčbě řady nevléčitelných nádorových onemocnění (55). Rozbor účinnosti experimentální imunoterapie využívající DB u jednotlivých nádorových onemocnění nebyl předmětem tohoto sdělení. V této době jsou

dendritické buňky zkoumány v klinických studiích fáze I/II u řady nádorových onemocnění. První zkušenosti s využitím vakcinace DB ukazují, že je pozorována léčebná odpověď u části nemocných. Na dlouhodobé výsledky a podrobné zhodnocení této perspektivní léčebné metody budeme několik let ještě počkat.

(Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 6152, GAČR 301/00/0405, IGF 4/99, MŠMT VZ J07/98-141100003, MŠMT J07/98-6700008 a výzkumným záměrem MZ ČR 0065269705)

Poděkování: Děkujeme prof. MUDr. Jindřichovi Lokajovi, CSC., z Ústavu klinické imunologie a alergologie FN USA, za užitečnou diskusi při sepsání této práce.

Literatura:

1. Österborg A, Masucci M, Bergenbrant S, Holm G, Lefvert AK, et al. Generation of T cell clones binding F(ab')₂ fragments of the idiotypic immunoglobulin in patients with monoclonal gammopathy. *Cancer Immunol Immunotherapy* 1991; **34**: 157-162.
2. Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996; **24**: 859-862.
3. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 121-135.
4. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 137-151.
5. Maraskovsky E, Roux E, Yeepe M et al. Dramatic increase in the numbers of dendritic cells in the peripheral blood of healthy volunteers treated with Flt3L. *Proceedings of 13th Eur Immunol Meeting* 1997: Amsterdam (ed H Wagner et al) Elsevier 202.
6. Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki A, Grouard G, Briere F, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**: 1183-1186.
7. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 1973; **137**: 1142-1161.
8. Hart DNJ, Newton MR, Reece-Smith H, Fabre JW, Ting A, et al. Localization of HLA-ABC and DR antigens in human kidney. *Transplantation* 1981; **31**: 428-433.
9. Galy A, Morel F, Hill B, Chen BP. Hematopoietic progenitor cells of lymphocytes and dendritic cells. *J Immunotherapy* 1998; **21**: 132-141.
10. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; **90**: 1458-1470.
11. Hart DNJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; **90**: 3245-3287.
12. Williams LA, Egener W, Hart DN. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol* 1994; **153**: 41-103.
13. Sallusto F, Cella M, Daniel C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; **182**: 389-400.
14. Melichar B, Savary C, Kudelka A P, Verschraegen C, Kavanagh J. Lineage-negative human leukocyte antigen-DR+ cells with the phenotype of undifferentiated dendritic cells in patients with carcinoma of the abdomen and pelvis. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 799-809.
15. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; **82**: 487-493.
16. Austyn JM, Larsen CP. Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 1990; **49**: 1-7.
17. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-252.
18. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* 1997; **158**: 4543-4547.
19. Fossus S. Lymph-borne dendritic leucocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become interdigitating cells. *Scand J Immunol* 1988; **27**: 97-105.
20. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988; **167**: 632-645.
21. Lardon F, Snoeck HW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, et al. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology* 1997; **91**: 553-559.
22. Saraya K, Reid CD. Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood. *Brit J Haematol* 1996; **93**: 258-264.
23. Szaboles P, Moore MA, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* 1995; **154**: 5851-5861.
24. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I, Banchereau J, et al. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**: 2376-2385.
25. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; **184**: 695-706.
26. Bernhard H, Disis M L, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, et al. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995; **55**: 1099-1104.
27. Herbst B, Kohler G, Mackensen A, Veelken H, Mertelsmann R, et al. CD34+ peripheral blood progenitor cell and monocyte derived dendritic cells: a comparative analysis. *Brit J Haematol* 1997; **99**: 490-499.
28. Lopez M, Amorim L, Gane P, Cristoph A, Bardin D, et al. IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J Immunol Methods* 1997; **208**: 117-129.
29. Mackensen A, Herbst B, Kohler G, Wolff-Vorbeck G, Rosenthal FM, et al. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood* 1995; **86**: 2699-2707.
30. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**: 1292-1302.
31. Fearley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DN. Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* 1997; **89**: 3708-3716.
32. Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 1990; **85**: 955-961.
33. Pfeiffer S, Apperley JF, Goldschmidt H, Gooding RP. Ex vivo generation and function of dendritic cells in multiple myeloma. *Biochem Soc Transactions* 1997; **25**: 364.
34. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 431-441.
35. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; **180**: 83-93.
36. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; **360**: 258-261.
37. Santiago-Schwarz F, Divaris N, Kay C, Carsons SE. Mechanisms of tumor necrosis factor-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced dendritic cell development. *Blood* 1993; **82**: 3019-3028.
38. Chen BG, Shi Y, Smith JD, Geiger DCh, Mule JJ, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood* 1998; **91**: 4652-4661.
39. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R et al. Generation of human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; **92**, 11: 4238-4247.
40. Young JW, Szaboles P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that

- are expanded by c-kit ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995; **182**: 1111-1119.
41. Strobl H, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 1996; **157**: 1499-1507.
 42. Maraskovsky E, Roux E, Tepee M, McKenna HJ, Brasel K et al. The effect of Flt3 ligand and/or c-kit ligand on the generation of dendritic cells from human CD34+ bone marrow. *Blood* 1996 **88**(Suppl):159(abstr).
 43. Soligo D, Deliliers GL, Servida F, Caneva L, Lamorte G, et al. Expansion of dendritic cells derived from human CD34+ cells in static and continuous perfusion cultures. *Brit J Haematol* 1998; **101**: 352-363.
 44. Steinbrink K, Woitl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; **159**: 4772-4780.
 45. Ye Z, Gee AP, Bowers WE, Lamb LS, Turner MW, et al. In vitro expansion and characterization of dendritic cells derived from human bone marrow CD34+ cells. *Bone Marrow Transplantation* 1996; **18**: 997-1008.
 46. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; **93**: 2588-2592.
 47. Mackey MF, Gunn JR, Maliszewski Ch, Kikutani H., Noelle RJ, et al. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 1998; **161**: 2094-2098.
 48. Makino M, Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand J Immunol* 1997; **45**: 618-622.
 49. Yang S, Darrow TL, Vervaert CE, Seigler HF. Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow. *Cellular Immunol* 1997; **179** 84-95.
 50. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; **4**: 594-600.
 51. Bohlen H, Titzer S, Christensen O, Manzke O. Dendritic cell based idiotype vaccination in multiple myeloma. *Blood* 1997; **90** (Suppl): 579 (abstr).
 52. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 659-668.
 53. Hájek R. Butch: Dendritic Cell Biology and the Application of Dendritic Cells to Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Medical Oncology* 2000, **17**, 2-15.
 54. Hájek R, Bourková L, Bulíková A, Vidláková P, IMareschová I et al.: Kultivace, aktivace a expanze dendritických buněk u mnohočetného myelomu. XII. český a transfuziologický sjezd s mezinárodní účastí. Olomouc 1999, abstr. 113.
 55. Bubenik J. Dendritic-cell-based cancer vaccines. *Folia Biol* 1999; **45** (3): 71-74
 56. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 1995; **23**: 1465-1473.

knihy

VÝŽIVA V ONKOLOGII.

Z. WILHELM A KOL.

Faktory výživy byly dosud v klinické onkologii zmiňovány spíše v souvislosti s kancerogenezou, mnohdy jako velmi obecná doporučení nebo jen se zaměřením na jednotlivosti (vláknina, tuk) bez vysvětlení hlubších souvislostí. Na výživu onkologicky nemocných je pak nezdědká pohlíženo jako na oblast periferního významu, přestože je kvantitativně zřejmě jedním z nejpodstatnějších faktorů celé podpůrné léčby a péče nemocné s nádory. V průběhu onkologické léčby a s progresí onkologického onemocnění také dochází ke změnám potřeb, tolerance a požadavků na výživu a substituci jejich jednotlivých složek, ať již v enterálním či přechodně parenterálním podání. Tato doporučení by mohlo být zavádějící podávat odtržně jen s ohledem na stav nebo diagnózu a bez kontextu s celým komplexem patofyziologických souvislostí. Onkologům a všem lékařům pečujícím o onkologicky nemocné se dostává do rukou stručná, a přitom velmi obsažná monografie kolektivu předních odborníků na výživu vedeného Z. Wilhelmem, která nesporně vyplní dosavadní mezeru moderně uspořádaných poznatků o výživě v souvislosti s nádorovými chodobami. V třinácti kapitolách je na 160 stranách pojednáno o fyziologii metabolismu substrátů a energetických zdrojů a změnách

navozených onkologickým onemocněním. Pozornost je dále věnována vyšetření nutričního stavu a stanovení energetické potřeby. Speciální problematiku představují malnutriční komplikace chemoterapie, radioterapie i důsledky nádorové kachexie. Obsáhlé kapitoly jsou věnovány zvláště enterální a parenterální výživě s ohledem na jednotlivé onkologické diagnózy a situace a zíměny jsou také zásady předoperační nutriční přípravy onkologicky nemocných. V souhrnu jsou základní poznatky uvedeny v kapitole o algoritmech nutriční péče. Zvláštní kapitoly jsou věnovány také nutričním antikancerogenům a významu vlákniny ve stravě. Monografii účelně doplňuje přehled referenčních hodnot laboratorních vyšetření. Brožované vydání práce Institutem pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně splňuje veškeré nároky také estetickým dojmem a přehledností zpracování. Útlou knížku Z. Wilhelma a kolektivu Výživa v onkologii lze doporučit jako pracovní příručku do knihovny každého onkologa a lékaře přicházejícího do styku s onkologickými pacienty, je srozumitelná také pro sestry a studující lékařství, vhodná pro specializované postgraduální kurzy. Lze bez pochyb očekávat, že velmi pozitivně ovlivní poněkud zanedbávaný stav informovanosti na tomto poli a posílí zájem o nutriční aspekty onkologické péče.

Jan Žaloudík

VÝZNAM PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ PŘI VOLBĚ OPTIMÁLNÍ LÉČEBNĚ STRATEGIE U NON-HODGKINSKÝCH LYMFOMŮ

IMPORTANCE OF PROGNOSTIC FACTORS IN A CHOICE OF OPTIMAL THERAPEUTICAL STRATEGY IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

PAPAJÍK T., RAIDA L., INDRÁK K.

HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLOMOUC

Souhrn: Non-hodgkinské lymfomy představují nesourodou skupinu nádorových onemocnění. Mezi jejich charakteristické rysy patří variabilita průběhu choroby nejen mezi odlišnými histologickými jednotkami, ale také uvnitř nich. K výběru optimálního druhu a intenzity terapie je nutno zhodnotit individuální riziko nemocného. K tomuto posouzení slouží jednotlivé prognostické faktory nebo prognostické indexy. Za základní prognostické parametry jsou dnes považovány věk nemocného, stav jeho fyzické výkonnosti, stádium choroby, postižení extranodálních orgánů a hodnota laktát-dehydrogenázy. Tyto faktory vytvářejí Mezinárodní prognostický index (IPI), který se začíná používat jako standardní prognostický ukazatel pro všechny typy non-hodgkinských lymfomů. Z nových prognostických znaků se zdají být důležité zejména hodnota β_2 -mikroglobulinu, indikátory proliferace aktivity nádorových buněk a genetické změny.

Klíčová slova: Non-hodgkinské lymfomy – prognostické faktory – mezinárodní prognostický index.

Summary: Non-Hodgkin's lymphomas constitute a heterogeneous group of malignancies. Variability of course not only among different histological entities but also within each of them belong to their characteristic features. Evaluation of individual patient's risk is necessary for optimal choice of therapy and its intensity. For this purpose we have single prognostic factors or prognostic indexes. Age, performance status, disease stage, involvement of extranodal sites and lactate-dehydrogenase value are considered as basic prognostic factors. These factors create the International prognostic index (IPI) which can be used as standard prognostic indicator for all types of non-Hodgkin's lymphomas. Some new prognostic parameters seem to be important – especially β_2 -microglobulin, markers of proliferating activity of neoplastic cells and genetic changes.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma – prognostic factors – International prognostic index

Úvod

Non-hodgkinské lymfomy (NHL) představují velkou a relativně nesourodou skupinu onemocnění vycházejících z nádorově transformovaného klonu lymfocytů. Hlavní důvod nesourodosti představuje široká škála histologických subtypů, uzlinový či mimouzlinový původ, lokalizovaný výskyt či tendence ke generalizaci. Vedle těchto specifických známek pak projevy choroby dotváří věk pacienta a eventuelní přidružená onemocnění. Tyto faktory ovlivňují rozhodování lékaře o použití nejvhodnějšího terapeutického postupu pro daného nemocného (1,3,5,18). Dnešní moderní způsoby chemo- i radioterapie, vysoce dávkovaná léčba s podpůrným podáním vlastních kmenových buněk a transplantace krvetvorných buněk od dárce s sebou nesou zásadní požadavek - vybrat pro určitého pacienta s přesně definovanou chorobou odpovídající metodu léčby. Mezi prvotní úkoly takového postupu patří stratifikace nemocných podle prognostického rizika. Vysoce rizikovní nemocní nejsou většinou efektivně léčeni standardními metodami, ale mohou ve výrazné míře profitovat z vysoce dávkované chemoterapie, transplantace krvetvorných buněk od dárce či z nového, experimentálního způsobu léčby. A naopak - nízké rizikovní nemocní jsou efektivně léčeni dnešním standardním způsobem chemoterapie či radioterapie, léčba vysoce dávkovaná u nich nepřináší podstatnější zlepšení prognózy při vysoké toxicitě a riziku úmrtí spojeného s takovouto procedurou (11,32,33). K odpovědnému posouzení výše uvedených požadavků slouží vyšetření a zhodnocení dobře definovaných prognostických faktorů, známých ve velké většině ještě před zahájením léčby.

Historie

Prvním krokem k posouzení prognostického rizika byla aplikace Ann Arborského stážovacího systému Hodgkinovy choroby na nemocné s NHL. Tento systém, používaný po téměř 20 let jako určitý standard, nevyhovoval pro extranodální NHL čítající až 1/4 ze všech případů a se zvyšující se účinností chemoterapeutických režimů začal ztrácet svoji výpovědní hodnotu také pro primárně nodální NHL (12,33). Od počátku 80. let byla zkoumána a popsána celá řada nezávislých prognostických parametrů, na jejichž základě byly v první polovině 90. let zkonstruovány prognostické indexy - nejznámější a nejpoužívanější z nich - Mezinárodní prognostický index (IPI) - dnes slouží jako určitý minimální standard k popisu individuálního rizika nemocných s NHL (11,12,32,33). Přehled jednotlivých prognostických znaků uvádí Tab.1.

Věk nemocného

Starší nemocní reagují hůře na chemoterapii, dosahují menšího počtu remisí a častěji relabují. Hranice mezi „mladšími“ a „staršími“ nemocnými leží někde mezi 55 - 65 roky. Francouzská GELA skupina prokázala rozdílné přežití u 3 skupin nemocných: do 50 let, mezi 50 a 65 roky a nad 65 let (12). Mezinárodní prognostický index bere jako hranici věk 60 let (32). Starším pacientům bývá totiž většinou podána chemoterapie s nižší dávkovou intenzitou (DI), ať už z důvodů objektivních (přidružené choroby, komplikace předchozího cyklu) či subjektivních (obavy lékaře z komplikací). Při dodržení DI nebývá rozdíl léčebných výsledků statisticky významný (24).

Tab. 1. Přehled hlavních prognostických faktorů non-hodgkinských lymfomů

1. Růst nádoru a jeho invazivní potenciál.
<ul style="list-style-type: none"> ● Stádium (Ann Arbor) ● Velikost tumoru ● Počet postižených extranodálních orgánů ● Postižení kostní dřevě ● Hodnota LDH, β_2-mikroglobulinu, sérové tymidinkinázy, hemoglobinu a albuminu ● Stupeň proliferace nádorových buněk ● Imunofenotyp, exprese adhezivních molekul ● Cytogenetické a molekulárně-genetické změny
2. Odpověď nemocného na přítomnost nádoru.
<ul style="list-style-type: none"> ● Stav výkonnosti nemocného (performance status) ● B symptomy ● Sekrece cytokinů buňkami imunitního systému
3. Schopnost nemocného tolerovat intenzivní terapii.
<ul style="list-style-type: none"> ● Věk ● Přidružené choroby
4. Faktory závislé na osobě ošetřujícího lékaře
<ul style="list-style-type: none"> ● Erudice, zkušenost ● Volba léčebného režimu ● Dodržování dávkové intenzity

Obecně by mělo platit, že nejsou-li přítomny závažnější přidružené choroby a nemocný je v biologicky dobrém stavu, pak by věk neměl být omezujícím faktorem pro podání kurativní terapie v plné dávce (12).

Stádium choroby (Ann Arbor)

Je obtížné aplikovat systém vyvinutý pro popis pokročilosti Hodgkinovy choroby na nemocné s NHL. 20-25 % všech NHL primárně postihuje extranodální orgán a většina folikulárních lymfomů (FL), mantle cell lymfomů (MCL) a difúzních lymfocytárních lymfomů (SLL) infiltruje kostní dřevě - výpovědní hodnota stádia je v takovéto situaci malá. U difúzních velkobuněčných lymfomů (DLCL), jež jsou biologicky Hodgkinově chorobě blízko, si tento systém svou výpovědní hodnotu naopak zachovává (11,12,13,32).

Počet postižených uzlinových lokalizací

Počet postižených uzlinových lokalit odráží velikost nádorové masy a růstový potenciál nádoru. V některých studiích byl prokázán prognostický význam počtu oblastí zvětšených uzlin, v multivariantních analýzách však tento faktor nenabýval významu (11,12,32).

Počet postižených extranodálních orgánů.

Tento faktor vyžaduje podrobné sčítání za použití nejmodernějších zobrazovacích a laboratorních metod a postižení více než jednoho extranodálního orgánu se jeví jedním z nejsilnějších nezávislých prognostických faktorů i v multivariantních analýzách (11,32).

Specifické extranodální lokalizace

Postižení kostní dřevě. Ve většině případů indolentních lymfomů je pravidlem (70 %) a výrazněji prognózu neovlivňuje. U nemocných s DLCL se vyskytuje jen ve 20-25 % případů a títo jedinci mají v univariantních analýzách horší vyhlídky na přežití (podobně též jedinci s lymfoblastickým a Burkittovým lymfomem), i když moderní léčba tento faktor stírá a v multivariantních analýzách si nezachovává svou výpovědní hodnotu (5,12,28,32).

Postižení centrální nervové soustavy (CNS). Týká se jiných než primárních CNS lymfomů. Zde postižení reflektuje disseminaci choroby a bývá spojené s horší prognózou především díky tomu, že títo nemocní mají také přítomny další prognosticky nepříznivé charakteristiky. Nelze říci, že by nemocní

s CNS postižením měli horší prognózu než nemocní bez takového postižení při shodném výskytu dalších nepříznivých prognostických parametrů - za špatnou prognózu je obecně zodpovědný značný rozsah choroby (12,13,14).

Postižení varlat. Platí totéž co bylo řečeno o CNS postižení. **Pleurální výpotek.** V univariantních retrospektivních studiích byla nalezena prognostická přínosnost, nyní se význam tohoto parametru stírá použitím jiných prognostických hodnocení a adekvátně vedenou moderní léčbou (6,11).

„B“ symptomy

Tyto projevy reakce organismu na nádor (váhový úbytek větší jak 10 % za posledních 6 měsíců, horečky nejasného původu větší jak 38 st.C po dobu delší jak 1 týden, intenzivní noční poty) byly extensivně studovány a používány jako prognostický indikátor v historických pracech. Jedná se o nepřímý důkaz sekrece nejrůznějších cytokinů (interleukiny) buňkami imunitního systému. Prognostický význam B symptomů je nahrazen lépe definovanými a jednodušeji specifikovanými charakteristikami (performance status) (6,11,32).

Performance status

Schopnost vést normální život může být měřena podle různé škály - v praxi nejčastěji dle Eastern Clinical Oncology Group (ECOG) či dle D.A.Karnovského. Toto vyšetření funkčního stavu je v onkologii široce užívané k zjištění ztráty normální výkonnosti způsobené fyziologickým a psychologickým efektem přítomnosti nádoru. ECOG škála je jednodušší, a proto také častěji užívaná (6,11,32). Špatný stav výkonnosti je spojen s horší prognózou, což dokazuje většina větších studií, a tento parametr si zachovává silnou prognostickou hodnotu i v multivariantních analýzách.

Hodnota laktát-dehydrogenázy

Laktát-dehydrogenáza (LDH) je cytoplasmatický enzym, jehož hladina v krvi se zvyšuje při lýze buňky pomocí různých mechanismů (poškození virem, ischemií, spontánní buněčná smrt). U NHL odráží zvýšená hladina LDH agresivitu tumoru spojenou se zvýšeným buněčným obrátem a velikost nádorové masy. Existuje lineární vztah mezi hladinou LDH a vnímavostí k chemoterapii: čím vyšší hladina LDH, tím horší odpověď na chemoterapii. LDH je jeden z nejsilnějších nezávislých prognostických faktorů u lymfoidních malignit (6,11,28,32,34,35).

Hladina β_2 -mikroglobulinu v séru

Tento malý polypeptid (11,8 kD) je vlastně lehkým řetězcem HLA antigenního komplexu, jenž se nekovalentně váže ke glykosylovanému proteinu těžkého řetězce. Jak v buněčných kulturách, tak i v klinických podmínkách byl opakovaně prokázán vztah mezi velikostí nádorové masy, respektive jejím biologickým chováním, a sérovou hladinou tohoto proteinu. U NHL byla detekována strukturální porucha v jednotlivých částech HLA komplexu, což má za následek poškození normální vazby mezi lehkými a těžkými řetězci a zvýšené uvolňování β_2 M do séra. Vyšší hladiny β_2 M (> 3,0mg/l) byly detekovány u nemocných, u kterých často nebyla zjištělná exprese MHC antigenů I.třídy. A právě rozpoznání specifických nádorových antigenů cytotoxickými T-lymfocyty je vázáno na expresi MHC antigenů I.třídy. Chybění exprese vede k úniku z normální imunitní reakce a tak následně i k progresi tumoru (15,25). Použitelnost β_2 M prokázaly nezávisle na sobě mnohé práce. Od 90. let je sérová hladina tohoto proteinu (dělicí hranice leží většinou kolem 3,0 mg/l) standardně brána jako významný prognostický faktor (samostatně nebo v kombinaci s LDH a s-TK) dosažení CR, trvání DFS a OS (15,25,34,35).

Hodnota sérové tymidinkinázy

ATP-tymidin-5'-fosfotransferáza (tymidinkináza - s-TK) je buněčný enzym účastnící se DNA syntézy. Aktivuje se během

G₁/S fáze buněčného cyklu a její aktivita koreluje s proliferační aktivitou nádorových buněk. Sérová hladina koreluje s buněčnou koncentrací a stejně jako hodnota β2M se stává cenným prognostickým faktorem u lymfoproliferativních chorob (15,16,23). Hladina koreluje s ostatními parametry jako jsou LDH, β2M, IPI s pravděpodobností dosažení CR, s délkou intervalu bez známk choroby a celkového přežití (9,16). Neexistuje přesná hranice, od které by byla s-TK vnímána jako nepříznivá známka. Někteří autoři popisují jako hranici 7 U/l, jiní 10 U/l, zřejmě také v závislosti na použité metodice (15,16).

Hodnota albuminu v séru

Tato veličina nebyla v posledních letech důkladněji studována, i když z některých studií je známo, že nižší hladina albuminu (méně jak 35 g/l) je spojena s horší odpovědí lymfomu na terapii a s vyšším rizikem úmrtí na toxicitu chemoterapie. Většinou však byl význam hodnocení albuminu v séru prokázán jen v univariantských analýzách (11,32).

Hladina hemoglobinu

O tomto ukazateli platí zhruba totéž, co bylo řečeno o hodnotě sérového albuminu. Silnější prognostický význam nízké hladiny albuminu byl pozorován u indolentních NHL, a obecně platí, že nízká hladina hemoglobinu nemusí odrážet stupeň infiltrace kostní dřene nádorem (12).

Sekrece cytokinů buňkami imunitního systému

Prognostický význam těchto faktorů není ještě plně zhodnocen, a to především díky nízkým počtům nemocných, u kterých byly tyto veličiny sledovány. Nejčastěji bývají uváděny následující parametry: hladina interleukinu-6, interleukinu-10, solubilního receptoru pro interleukin-2 a tumor-nekrotizujícího faktoru (8,12,31,38). Určení jejich přesného významu a specifické výpovědní hodnoty bude muset být náplní dalších studií.

Stupeň proliferace nádorových buněk

Schopnost nádorových buněk proliferovat je považována za významný parametr odrážející biologické chování nádoru a jeho prognostický výhled. K dnešnímu dni jen málo studií hodnotí stupeň proliferace a celkové přežití u NHL v multivariantské statistické analýze. Nejčastější metodou používanou k přímé detekci proliferace aktivity lymfomových buněk je vyšetření nukleárních antigenů spojených s proliferací. Jedná se o antigen Ki-67 a PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Již Grogan v roce 1988 prokázal, že nemocní s pozitivitou Ki-67 větší jak 60 % mají výrazně horší přežití než jedinci s nižšími hodnotami antigenu (8 měsíců versus 39 měsíců), některé studie berou jako hranici 80 % pozitivních buněk (27,39). Méně podobných zkušeností bylo publikováno s použitím antigenu PCNA. Nutno podotknout, že proliferace aktivita se jeví jako statisticky nezávislý a silný prognostický faktor celkového přežití nemocných s NHL (27,33,40).

Expresce adhezivních molekul

Zdravé, ale i patologické lymfocyty adherují k okolním buňkám a k extracelulární matrix pomocí škály povrchových receptorů - faktorů adheze. Expresce některých adhezivních molekul je spojena se způsobem šíření lymfomových elementů. Výskyt ICAM-1 (CD54) antigenu je referován u asi 2/3 B-NHL, jeho chybění je dááno do souvislosti s generalizací lymfomu a postižením kostní dřene (19,36). N-CAM antigen se nachází na povrchu buněk T-lymfomů, které infiltrují nezvyklá anatomická místa pro šíření těchto lymfomů - gastrointestinální trakt, svaly, nosohltan a CNS (12). Expresce CD44 antigenu („lymphocyte homing receptor“ - LHR) vede podle mnohých zjištění k vazbě na endotelie venul a umožňuje extravazaci lymfomových buněk a jejich další šíření - „metastazování“. Tento fakt má za následek vyšší agresivitu nádoru, horší reakci na léčbu a kratší přežití nemocných (29,33).

Tab. 2: Prognostický index agresivních NHL (Coiffier).

Index	Tumor >10 cm	2 a více extranodál. lokalit	Stádium III nebo IV	Zvýšená hladina LDH	3-leté přežití
1	Ne	Ne	Ne	Ne	88 %
2	»	Přítomny 1-2 faktory	«	Ne	71 %
2	Ne	Ne	Ne	Ano	72 %
3	Ano	Ano	Ano	Ne	53 %
3	»	Přítomny 1-3 faktory	«	Ano	38 %

Tab. 3: Mezinárodní prognostický index.

Rizikové faktory - všechny věkové skupiny
Věk (<60 vs >60 let)
LDH (norma vs zvýšená hladina)
Stav nemocného - PS dle ECOG (0,1 vs 2-4)
Extranodální postižení (1 orgán vs >1 orgán)
Stádium (I,II vs III,IV)
Rizikové faktory - nemocní do 60 let
Stádium (I,II vs III,IV)
LDH (norma vs zvýšená hladina)
Stav nemocného - PS dle ECOG (0,1 vs 2-4)

Tab. 4: Rozdělení nemocných dle IPI v původním souboru (Shippová).

IPI	Rizik. ff.	Počet pac.	CR	RFS (2 roky)	RFS (5 let)	OS (2 roky)	OS (5 let)
L	0-1	35 %	87 %	79 %	70 %	84 %	73 %
LI	2	27 %	67 %	66 %	50 %	66 %	51 %
HI	3	22 %	55 %	59 %	49 %	54 %	43 %
H	4-5	16 %	44 %	58 %	40 %	34 %	26 %

Vysvětlivky: L - nízké riziko, LI - nižší střední riziko, HI - vyšší střední riziko, H - vysoké riziko. CR - kompletní remise, RFS - doba bez známek choroby, OS - celkové přežití.

Imunofenotyp

Povrchové antigeny dělí NHL na dvě základní velké podskupiny: lymfomy vycházející z B-lymfocyту a lymfomy vycházející z T-lymfocyту (důžno podotknout, že můžeme nalézt také lymfomy bifenotypické či bez této antigenní diferenciacce). Dlouhodobě nevyřešenou otázkou zůstává, zda mají T-lymfomy obecně horší prognostický výhled, respektive, je-li T-fenotyp samostatným nepříznivým prognostickým ukazatelem. V historických studiích, které mimochodem čítají jen malé procento nemocných s T-lymfomy, se tyto lymfomy řadí k agresivním variantám s velmi špatnou prognózou. Mladší práce již tak jednoznačný závěr nepřinášejí. V některých se T-lymfomy dají co do léčebné odezvy a prognózy srovnat s odpovídajícími B-lymfomy, v jiných pracích je opravdu T-fenotyp spojen s kratším celkovým přežitím (2,4,10,22). Podle posledních prací (zejména J. O. Armitage - přehled čítající 1403 pacientů, 1998) má tento jev logické vysvětlení: většina T-lymfomů (pokud nebudeme počítat prognosticky velmi příznivý anaplastický T-velkobuněčný lymfom) je diagnostikována v pokročilém stádiu (stádium III a IV v cca 80 %), s elevací LDH (téměř 2/3 pacientů), s IPI 2 a větší ve více jak 80 % případů. Celkové přežití se v 5. roce od diagnózy pohybuje v rozmezí 20-25 % (5). Tyto hodnoty opravdu vyznívají prognosticky velmi nepříznivě a jsou srovnatelné například s charakteristikami mantle cell lymfomu nebo lymfoblastického lymfomu. Lze tedy shrnout, že T-fenotyp s sebou opravdu přináší určité vyšší riziko pro nemocného a že k těmto lymfomům je nutné přistupovat způsobem odpovídajícím jejich agresivnímu chování.

Cytogenetické a molekulárně-genetické změny

Určité chromosomální translokace bývají úzce spojeny s přesně definovanými subtypy NHL. Jejich definitivní prognostický přínos není plně zhodnocen, i když se většinou zdá, že u této skupiny chorob budou mít jen zpřesňující diagnostický význam a prognostický význam budou mít zřejmě jiné změny genotypu (37,40).

Jedná se zejména o chybění části chromosomů či mutace některých genů. Do dnešního dne byly identifikovány jako nepříznivé některé často se opakující abnormality. Jde zejména o ztráty v oblasti krátkých (1p32-36) a dlouhých ramen (1q21-23) chromosomu 1, změny v oblasti chromosomu 3 (3q27), 6 (6q21-27), 7, 8 (8q24), 14 (14q11-12). Změny v oblasti krátkých ramen chromosomu 17 (delece či mutace genu p53 - tumor suppressor gen) patří k velmi silným nezávislým nepříznivým prognostickým znakům u všech lymfoidních malignit. Jejich výskyt u folikulárních lymfomů je často spojován s histologickou transformací, obecně jsou lymfomy s touto změnou agresivní, v pokročilém stádiu, rezistentní k léčbě s kratším mediánem celkového přežití (12,20,21,23,30,37,39,40).“

Prognostické indexy

Coiffierův prognostický index. V roce 1991 publikovala mezinárodní skupina hematologů pod vedením B.Coiffiera nový komplexní systém prognostického hodnocení nemocných s agresivními maligními lymfomy (11). Pečlivou statistickou analýzou souboru 737 pacientů dospěli autoři k finálnímu výběru několika nejsilnějších a nezávislých prognostických ukazatelů (velikost nádorové masy, počet postižených extranodálních lokalit, vyšší stádium choroby, zvýšená hladina LDH), jejichž syntézou byl následně zkonstruován Prognostický Index. Jeho jednotlivé hladiny dobře korelovaly s pravděpodobností přežití nemocných ve 3.roce od diagnózy choroby. Jeho strukturu proto uvádíme v Tab.2.

V diskuzi k práci autoři uvedli, že index dovoluje identifikovat takové nemocné, u kterých, ač dosáhneme léčbou I. linie CR, dochází v krátkém intervalu k relapsu a rychlé progresi choroby. Tito jedinci mohou profitovat ze zařazení vysoce dávkované chemoterapie jako intenzifikace po základní chemoterapii nebo z některého z nových experimentálních postupů.

Mezinárodní prognostický index (International Prognostic Index - IPI).

Autoři předešlého indexu a jejich základní myšlenka se stali osou Mezinárodního projektu prognostických faktorů u NHL. Kolektiv autorů z Evropy a Severní Ameriky pod vedením M.A.Shippové (celkem 16 institucí a kooperativních skupin) zhodnotil soubor 3273 nemocných s agresivními NHL a na analýze úplných dat od 2031 pacientů zkonstruoval dnes již široce známý Mezinárodní prognostický index a jeho podtyp - věku přizpůsobený IPI (pro nemocné mladší 60 let) (Tab.3) (32,33).

Každý nepříznivý stav (věk nad 60 let, vyšší hladina LDH, horší stav výkonnosti nemocného, více jak 1 postižený extranodální orgán, stádium III a IV) je hodnocen 1 bodem, body se sečtou a nemocný se zařadí do rizikové skupiny IPI (low-risk=L, low-intermediate risk=LI, high-intermediate risk=HI, high-risk=H). Rozvrstvení nemocných (všechny věkové skupiny) v původním souboru z uvedených práce dokumentuje tabulka (Tab.4). Z ní je zřejmé, že index signifikantně odděluje prognosticky rozdílné skupiny nemocných, a to nejen co do odpovědi na terapii, ale i z hlediska celkového přežití. Z toho vyplývá, že IPI se stává jakýmsi standardním měřítkem prognostického výhledu nemocných s agresivními lymfomy, slouží nejen k identifikaci nemocných s vysokým rizikem relapsu, ale také jako prototyp společného jazyka a měřítka při srovnávání výsledků různých terapeutických postupů a při přesné definici cílových skupin pacientů v budoucích klinických studiích.

Jakkoliv byl index konstruován pro nemocné s NHL vyšší malignity, brzy se potvrdila jeho aplikovatelnost i na nemocné s indolentními lymfoproliferacemi. Jedinou opakovanou výhradou je poměrně malý počet pacientů zařazených do skupiny s nejvyšším rizikem (2,6,7,17,26). Do ní většinou spadá méně jak 10 % jedinců, a přitom mezi nemocnými s indexem HI a LI můžeme nalézt pacienty, kteří vykazují výraznou agresivitu tumoru. Několikrát bylo proto v literatuře zdůrazněna nutnost doplnění této základní stratifikace o další parametry (např. β_2M) (33).

Index LDH a β_2 -mikroglobulinu.

β_2 -mikroglobulin v séru nemocných s NHL byl v době konstrukce IPI vyšetřován jen v několika málo centrech (byl znám jen u 215 z 3273 jedinců původního souboru v práci Shippové). To byl jediný důvod, proč tento faktor nebyl součástí IPI. Tým z M.D.Anderson Cancer Center v Texasu vyvinul na základě multivariátní analýzy index jednoduše hodnotící hladiny LDH a β_2 -mikroglobulinu (normální hodnoty obou veličin vs zvýšená hodnota jednoho ukazatele vs zvýšené hladiny obou znaků). Index ukázal svou velmi dobrou výpovědní hodnotu jak pro agresivní, tak pro indolentní lymfoproliferace a může sloužit jako další cenný prognostický ukazatel vedle IPI (35).

Faktory závislé na osobě ošetřujícího lékaře

Následující řádky budou možná znít na konci 20. století v zemi uprostřed Evropy poněkud kontroverzně, ale zdá se být velmi pravděpodobné, že výsledek léčby nemocného s NHL závisí také na tom, kdo určitou terapii indikuje a vede.

NHL bývají chorobami komplikovanými, a proto by také výběr optimální terapie měl být svěřen lékaři či zařízení, které má na tomto poli odpovídající zkušenosti. To znamená, že dotyčný lékař za kalendářní rok vidí nejméně 40 nových nemocných s non-hodgkinskými lymfoproliferacemi, má dobré laboratorní a paraklinické zázemí s předpokladem odpovídající následné podpůrné péče, je napojen na oblastní, národní nebo nadnárodní kooperativní skupinu, dovede provést odhad rizikovitosti choroby a umí vybrat adekvátní terapeutický režim, s jehož opakovaným podáváním má určité zkušenosti, respektive vede léčbu protokolárním způsobem. Tyto předpoklady pak výrazně snižují výskyt komplikací a riziko mortality spojené s léčbou (11,12).

Velmi výrazným faktorem ovlivňujícím prognózu nemocného bývá dodržování DI. Mnoho studií prokázalo, že nemocní, kteří dostávali redukované dávky základních cytostatik (antiracykliny, alkylační látky), měli výrazně horší odpověď na terapii a kratší celkové přežití než nemocní, kteří dostali plnou dávku chemoterapie. Zdá se, že tento předpoklad je důležitý hlavně pro prvních 12 týdnů léčby, kdy aplikované dávky cytostatik pod 70 % dávkou plánované mají výrazně horší léčebný výsledek (některé údaje hovoří o tom, že snížení dávky o 20 % vede ke snížení kurability o 50 %, a naopak zvýšení dávky na dvojnásobek může vést až k desetinasobnému protinádorovému účinku) (12). De Vita dokonce hovoří o tom, že volba dávky chemoterapeutik ad hoc v prvním léčebném režimu je ve většině případů zřejmě hlavním důvodem léčebného selhání u chemosenzitivních a kurabilních nádorů. Dodává, že „oba, pacient i lékař, musí zvážit riziko úmrtí na nádor v konfrontaci s přechodným prospěchem redukce nežádoucích účinků léčby“ (12).

Závěr

Stanovení individuálního prognostického rizika se hned po přesném stanovení diagnózy non-hodgkinského lymfomu stává klíčovým prvkem v plánování a stratifikaci léčebného přístupu k nemocnému s tímto typem nádoru. V dnešní době je dostupná celá paleta standardních prognostických parametrů, která umožňuje poměrně velmi přesnou klasifikaci rizika léčebného selhání a eventuelního relapsu choroby u nemocných s NHL. Tento postup pak vymezuje indikace rizikových

pacientů k moderně vedené vysoce dávkované, popřípadě transplantační léčbě. Zároveň s rozvojem medicínského poznání dochází také na poli prognostických faktorů k novým pohledům na jejich aplikaci, ke konstrukci nových indexů a uvede-

ní některých dříve jen experimentálně vyšetřovaných parametrů do rutinní klinické praxe.

Práce byla podpořena grantem IGA č. 312/98/0425.

Literatura.

1. Aisenberg A. C.: Coherent view on non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 13, 1995, s.2656-2675.
2. Ansell S.M., Habermann T.M., Kurtin P.J. et al.: Predictive capacity of the international prognostic factor index in patients with peripheral T-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 15, 1997, s.2296-2301.
3. Armitage J.O. and participants of the non-Hodgkin's lymphoma classification projects: A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89, 1997, s.3909-3918.
4. Armitage J. O., Vose J. M., Linder J. et al.: Clinical significance of immunophenotype in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 7, 1989, s.1783-1790.
5. Armitage J.O., Weisenburger D.D.: New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. *J.Clin.Oncol.* 16, 1998, s.2780-2795.
6. Bastion Y., Berger F., Bryon P.A. et al.: Follicular lymphomas: Assessment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann. Oncol.* 9, 1991, s.123-129.
7. Bastion Y., Coiffier B.: Is the international prognostic index for aggressive lymphoma patients useful for follicular lymphoma patients? *J.Clin.Oncol.* 12, 1994, s.1340-1342.
8. Blay J.Y., Burdin N., Rousset F. et al.: Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 82, 1993, s.2169-2174.
9. Bogni A., Cortionis A., Grasselli G., et al.: Thymidine kinase (TK) activity as a prognostic parameter of survival in lymphoma patients. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents.* 8, 1994, s.121-125.
10. Coiffier B., Brousse N., Peuchmaur M. et al.: Peripheral T-cell lymphomas have worse prognosis than B-cell lymphomas: A prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with LNH-84 regimen. *Ann.Oncol.* 8, 1990, s.45-50.
11. Coiffier B., Gisselbrecht C., Vose J.M., et al: Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas: description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. *J.Clin.Oncol.* 9, 1991, s.211-219.
12. Coiffier B., Salles G., Bastion Y.: Prognostic factors in non-Hodgkin's lymphomas. In Magrath E. (ed.): *The Non-Hodgkin's Lymphomas*, 2nd edition, London: Arnold, 1997, s.739-768.
13. Foon K.A., R.I.Fischer: Lymphomas. In: *Williams Hematology*, Fifth edition, McGraw-Hill Inc., 1995, s.1076-1096.
14. Haddy T.B., Adde M.A., Magrath I.T. et al.: CNS involvement in small non-cleaved-cell lymphoma: Is CNS disease per se a poor prognostic sign? *J.Clin.Oncol.* 9, 1991, s.1973-1982.
15. Hallek M., Wanders L., Ostwald M., et al: Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma* 22, 1996, s.439-447.
16. Hallek M., Wanders L., Strohmeyer S., et al: Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann.Hematol.* 65, 1992, s.1-5.
17. Hermans J., Krol A.D.G., van Groningen K., et al: International prognostic index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades. *Blood* 86, 1995, s.1460-1463.
18. Hiddemann W., Longo D.L., Coiffier B., et al: Lymphoma classification - the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 88, 1996, s.4085-4089.
19. Christiansen I., Gidlof C., Kalkner K.M. et al.: Elevated serum levels of soluble ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphomas correlate with tumour burden, disease activity and other prognostic markers. *Br.J.Haematol.* 92, 1996, s.639-646.
20. Ichikawa A., Hotta T., Takagi N. et al.: Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 79, 1992, s.2701-2707.
21. Koduru P.R.K., Raju K., Vadmal V. et al.: Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 1997, s.4078-4091.
22. Kwak L.W., Wilson M., Weiss L.M. et al.: Similar outcome of treatment of B-cell and T-cell diffuse large cell lymphomas: The Stanford experience. *J.Clin.Oncol.* 9, 1991, s.1426-1431.
23. Lehtinen T., Aine R., Kellokumpu-Lehtinen P., Hakala T., et al: Evaluation of plasma levels of thymidine kinase and mutated p53 in 81 patients with newly diagnosed malignant lymphoma. *Acta Oncol.* 32, 1993, s.779-781.
24. Lepage E., Gisselbrecht C., Haioun C. et al.: Prognostic significance of received relative dose intensity in non-Hodgkin's lymphoma patients: Application to LNH-87 protocol. *Ann.Oncol.* 4, 1993, s.651-656.
25. Litam P., Swan F., Cabanillas F. et al.: Prognostic value of serum β 2-microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann.Intern.Med.* 114, 1991, s.855-860.
26. Lopez-Guillermo A., Montserrat E., Bosch F., et al.: Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 12, 1994, s.1343-1348.
27. Miller T.P., Grogan T.M., Dahlberg S. et al.: Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 83, 1994, s.1460-1466.
28. Nicolaides C., Dimou S., Pavlidis N.: Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *The Oncologist* 3, 1998, s.189-197.
29. Ristamaki R., Joensuu H., Lappalainen K. et al.: Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 1997, s.4039-4045.
30. Sander C.A., Yano T., Clark H.M. et al.: p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 82, 1993, s.1994-2000.
31. Seymour J.F., Talpaz M., Cabanillas F. et al.: Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 13, 1995, s.575-582.
32. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R., et al: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 329, 1993, 987-994.
33. Shipp M.A.: Prognostic Factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has „high-risk“ disease? *Blood* 83, 1994, s.1165-1173.
34. Suki S., Swan F., Tucker S., et al: Risk classification for large cell lymphoma using lactate dehydrogenase, beta-2 microglobulin, and thymidine kinase. *Leuk.Lymphoma* 18, 1995, s.87-92.
35. Swan F., Velasquez W.S., Tucker S. et al.: A new serologic staging system for large cell lymphomas based on initial β 2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J.Clin.Oncol.* 7, 1989, s.1518-1527.
36. Teral M., Lopez-Guillermo A., Bosch F. et al.: Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: Relationship with tumor dissemination and prognostic importance. *J.Clin.Oncol.* 16, 1998, s.35-40.
37. Tilly H., Rossi A., Stamatoullas A. et al.: Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 84, 1994, 1043-1049.
38. Warzocha K., Salles G., Bienvenu J. et al.: Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J.Clin.Oncol.* 15, 1997, s.499-508.
39. Wilson W.H., Teruya-Feldstein J., Fest T., et al: Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89, 1997, s.601-609.
40. Winter J.N., Andersen J., Variakojis D. et al.: Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88, 1996, s.3919-3925.

IPHOSPHAMIDE AND ETOPOSIDE BASED CHEMOTHERAPY AS SALVAGE AND MOBILIZING REGIMENS FOR POOR PROGNOSIS LYMPHOMA

ZÁCHRANNÉ A PERIFERNÍ BUŇKY MOBILIZUJÍCÍ CHEMOTERAPIE ZALOŽENÁ NA KOMBINACI IFOSEFAMIDU A ETOPOSIDU U NEMOCNÝCH LYMFOMEM SE ŠPATNOU PROGNÓZOU

MAYER J., VÁŠOVÁ I., KOŘÍSTEK Z., NAVRÁTIL M., KLABUSAY M., DOUBEK M., VODVÁRKA P.¹, PETRÁKOVÁ K.², VORLÍČEK J., ČERNILOVÁ I.

DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE - HEMATOONCOLOGY, UNIVERSITY HOSPITAL, BRNO
¹DEPARTMENT OF RADIOTHERAPY AND CLINICAL ONCOLOGY, FACULTY HOSPITAL, OSTRAVA
²MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE, BRNO

Abstract: Background: Treatment of early relapsing or resistant non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and Hodgkin's disease (HD) is not satisfactory. High dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation offers the possibility to improve prognosis. We adopted the strategy of using salvage chemotherapy as debulking as well as PBSC mobilizing treatment. We used the regimens based on ifosfamide and etoposide because these drugs are not frequently used in the front-line treatment. **Patients and treatment:** Patients with NHL (n=32) received MINE chemotherapy (n=43, mesna, ifosfamide 1330 mg/m² and etoposide 65 mg/m² by i.v. infusions on days 1-3, mitoxantrone 8 mg/m² i.v. on day 1). The same schedule, but higher doses were used for PBSC mobilization (n=32, ifosfamide 1700 mg/m², etoposide 175 mg/m², mitoxantrone 10 mg/m²). Patients with HD (n=50) received VIM chemotherapy (n=116, mesna, ifosfamide 1200 mg/m² by i.v. infusion on days 1-5, etoposide 90 mg/m² by i.v. infusion on days 1, 3, and 5, methotrexate 30 mg/m² i.v. on days 1 and 5). After both VIM and MINE, mobilization chemotherapy was followed by G-CSF at the dose 5-16 µg/kg/day (mainly 10 µg/kg/day), depending on pretreatment of the patients. **Results:** The responses after VIM and MINE were CR 36% and 40%, PR 20% and 30%, and SD 24% and 4%, respectively. In both groups, patients with relapsing disease responded more better than those with primary progressive disease. Both regimens exhibited excellent mobilizing capacity. We performed 229 aphereses (median 3 leukaphereses per patient) starting on either day 13 (median: VIM), or on day 12 (median: MINE). In the vast majority of patients, the collection started in the time interval: median ± 1 day (n=70, 85%). The median yields were 10.7x10⁶ CD34⁺ cells/kg and 52.9x10⁴ CFU-GM/kg for VIM, and 12.5x10⁶ CD34⁺ cells/kg and 51.5x10⁴ CFU-GM/kg for MINE. We did not collect at least 2.5x10⁶ CD34⁺ cells/kg in only 7 patients (9%), and the harvested amount of CD34⁺ cells was lower than 1.0x10⁶/kg in only 2 patients (2%). The toxicity of all 191 VIM and MINE chemotherapies was minimal. PBSC collections were not complicated by chemotherapy-induced thrombocytopenia. Forty-seven HD patients (94%) and 26 NHL patients (81%) were transplanted (BEAM or BuCy2 regimens). The recovery of hematopoiesis was rapid in both groups of patients. Median time for reaching white blood cell count 1.0x10⁹/l was 10 days for both HD and NHL patients, and for thrombocytes > 50x10⁹/l 12 days for HD and 11 days for NHL patients, respectively. **Conclusion:** VIM and MINE are well-tolerated regimens providing significant anti-lymphoma effect and low toxicity. In combination with G-CSF, they also provide very good PBSC mobilizing capability in a predictable time interval. These regimens are also advantageous because of short-time leukopenia and mild thrombocytopenia, which is critical for ensuring uneventful apheresis. Compared with other regimens, VIM and MINE seem to offer multiple advantages

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease, peripheral blood stem cells, bone marrow transplantation, etoposide, ifosfamide

Souhrn: Úvod: Léčba časně relabujících a nebo rezistentních lymfomů (ne-Hodgkinovy lymfomy, NHL a Hodgkinova choroba, HD) je velmi neuspokojivá. Vysokodávková léčba s autologní transplantací periferních kmenových buněk (PBSC) nabízí možnost, jak prognózu zlepšit. Na našem pracovišti jsme použili strategii podávání záchranné a zároveň PBSC mobilizační léčby s využitím ifosfamidu a etoposidu. Tyto léky nejsou běžně používány v úvodní léčbě nemocných s lymfomy. **Soubor nemocných a metodika:** Pacienti s NHL (n=32) byli léčeni MINE chemoterapií (n=43, mesna, ifosfamid 1330 mg/m² a etoposid 65 mg/m² i.v. infuze dny 1-3, mitoxantron 8 mg/m² i.v. den 1). Stejně schéma, ale s vyššími dávkami, bylo použito pro mobilizaci: (n=32, ifosfamid 1700 mg/m², etoposid 175 mg/m², mitoxantron 10 mg/m²). Nemocní s HD (n=50) byli léčeni kombinací VIM (n=116, mesna, ifosfamid 1200 mg/m² i.v. infuze dny 1-5, etoposid 90 mg/m² i.v. infuze dny 1, 3, a 5, methotrexat 30 mg/m² i.v. dny 1 a 5). Po aplikaci mobilizační chemoterapie VIM nebo MINE následovalo podávání růstového faktoru G-CSF v dávce 5-16 µg/kg/den (většinou 10 µg/kg/den) v závislosti na předléčenosti nemocných. **Výsledky:** Léčebné odpovědi po VIM a MINE byly: CR 36% a 40%, PR 20% a 30%, SD 24% a 4%. Pro obě skupiny lymfomů platilo, že nemocní s relabující chorobou měli daleko lepší léčebnou odpověď než nemocní s chorobou rezistentní. Provedli jsme celkem 229 leukaferéz (medián 3 leukaferézy u jednoho nemocného) se zahájením den 13 (medián; VIM), nebo den 12 (medián; MINE). U naprosté většiny nemocných byl sběr PBSC zahájen v časovém intervalu: medián ± 1 den (n=70, 85%). Výťažnosti (medián) byly: 10.7x10⁶ CD34⁺ buněk/kg a 52.9x10⁴ CFU-GM/kg pro VIM a 12.5x10⁶ CD34⁺ buněk/kg a 51.5x10⁴ CFU-GM/kg pro MINE. Alespoň 2.5x10⁶ CD34⁺ buněk/kg se nepodařilo nasbírat pouze u 7 nemocných (9%) a získané množství CD34⁺ buněk bylo nižší než 1.0x10⁶/kg pouze u 2 nemocných (2%). Toxicita všech 191 VIM a MINE chemoterapií byla minimální. Sběr PBSC nebyl komplikován trombocytopenií indukovanou chemoterapií. Čtyřicet sedm nemocných s HD (94%) a 26 nemocných s NHL (81%) bylo transplantováno (režimy BEAM nebo BuCy2). **Obnova krevtvorby** byla rychlá u obou skupin nemocných. Medián dosažení leukocytů > 1.0x10⁹/l byl 10 dnů pro nemocné s NHL i HD a medián dosažení trombocytů > 50x10⁹/l byl 12 dnů pro nemocné s HD a 11 dnů pro nemocné s NHL. **Závěr:** VIM a MINE jsou velmi dobře tolerované režimy se významnými protilymfomovou aktivitou při nízké toxicitě. V kombinaci s G-CSF také vykazují velmi dobrou mobilizační kapacitu ve velmi dobře odhadnutelném časovém intervalu. Jejich výhodou je také v jen krátkodobé leukopenii a mírné trombocytopenii, což je důležité pro bezproblémové leukaferézy. Ve srovnání s jinými režimy jeví VIM a MINE chemoterapie mnohé výhody.

Klíčová slova: Ne-Hodgkinovy lymfomy, Hodgkinova choroba, periferní kmenové buňky, transplantace kostní dřeně, etoposid, ifosfamid

Introduction

Advanced-stage Hodgkin's disease (HD) and some non-Hodgkin's lymphomas (NHL) are neoplasias potentially curable with standard chemotherapy, but many patients do not achieve remission or their disease relapses (Cannelos et al., 1992, Fisher et al., 1993). One option how to improve these results is to intensify front-line chemotherapy, either by dose-escalation of conventional therapy (Diehl et al., 1998), or by adding high-dose chemotherapy with hematopoietic progenitor cell support (Carella et al., 1995, Haioun et al., 1999). Treatment of relapsing disease with conventional chemo- and/or radiotherapy is unsatisfactory, especially in early relapsing patients (Longo et al., 1992, Salles et al., 1994). However, there is also the possibility to improve prognosis of these patients by implementing the high dose chemotherapy into the treatment plan (Philip et al., 1995, Schmitz et al., 1999). Furthermore, high-dose chemotherapy is the effective salvage strategy for HD patients who do not enter remission after induction treatment (Sweetenham et al., 1999). For progressive disease of NHL patients, however, this kind of therapy usually fails (Mills et al., 1995). For above-mentioned reasons, the high dose therapy has become a standard part of management of many patients with lymphomas.

It is not entirely clear when to proceed to the high dose therapy (Phillips et al., 1997). Several reports showed better prognosis of those patients who were transplanted at the time of minimal tumor burden (Prince et al., 1996, Horning et al., 1997, Moskowitz et al., 1999). However, response to conventional salvage chemotherapy might only represent a good prognostic marker and it is not known whether deliberate maximization of pretransplant chemotherapy can improve the prognosis of patients. Some data, however, support the effort to achieve the maximum response before transplantation (Bosly et al., 1997).

During the last years, we have witnessed a dramatic replacement of bone marrow by peripheral blood stem cells (PBSC) for autotransplantation (Gratwohl et al., 1999). Usage of PBSC brings faster hematopoietic recovery and can be even cost saving (Smith et al., 1997). Growth factors (G-CSF or GM-CSF, granulocyte or granulocyte-macrophage colony stimulating factors) and/or a higher dose of cyclophosphamide are standards for adequate mobilization of PBSC, although other combinations of polychemotherapy and growth factors can be used. A combination of chemotherapy and growth factors is more effective than growth factors or chemotherapy alone and the intensity of chemotherapy correlates with the degree of PBSC mobilization (Demirer et al., 1996). In lymphoma patients, PBSC can also be mobilized with growth factors alone or by combination of high-dose cyclophosphamide and growth factors, but these regimens have little or no activity against malignant disease. Therefore, the best option seems to be the usage of the regimen that embodies proven mobilization ability and adequate anti-neoplastic activity, combining PBSC mobilization with tumor mass cytoreduction prior to administration of the conditioning regimen.

Few salvage regimens have been examined in combination with growth factors-stimulated PBSC mobilization (Fermé et al., 1994, Olivieri et al., 1995, Kröger et al., 1998, Donato et al., 1999, McQuaker et al., 1999, Moskowitz et al., 1999, Petit et al., 1999). In our study, we used the VIM regimen (VP-16, ifosfamide, methotrexate) (Nowrousian et al., 1987) for HD disease patients and MINE (mesna, ifosfamide, mitoxantrone - Novatrone, etoposide) (Rodriguez et al., 1995) for NHL patients. VIM is similar to the IMVP-16 regimen (Cabanillas et al., 1982). In this report, we have extended our observations published previously (Mayer et al., 1999) for a larger series of patients and for an analysis of engraftment kinetic.

Patients and methods

Patients

From September 1995 to September 2000, we treated 32 NHL and 50 HD patients, who were primarily refractory (n=21, 26%), partial responders to first-line therapy (usually ABVD and CHOP, n=17, 20%) relapsed (n=39, 48%), or very high risk after achieving complete remission (CR, n=5, 6%). Patients' characteristics are shown in table 1. Many patients were referred to our department from other departments for salvage therapy only. Therefore, we did not

Table 1. Patients' characteristics at the time of start of VIM or MINE salvage chemotherapy.

Patients' characteristics	HD (n=50)	NHL (n=32)
Age (years)	19-56, median: 29	18-63, median: 43
Male: female	27:23	13:19
Number of previous chemotherapy courses	2-32, median: 6	2-15, median: 7
Previous radiotherapy	n=31; 62%	n=8; 25%
Progressive disease	n=16; 32%	n=5; 16%
Partial remission after induction treatment	n=4; 8%	n=12; 38%
Stable disease after induction treatment	n=1; 2%	n=0
1 st relapse	n=17; 34%	n=11; 34%
2 nd or subsequent relapse	n=9; 18%	n=2; 6%
Complete remission in very high risk patients	n=3; 6%	n=2; 6%

Table 2. Chemotherapy VIM (salvage and/or mobilization).

Etoposide (Vepesid - Bristol - Myers Squibb)	90 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1,3,5
Ifosfamide (Holoxan - Asta Medica)	1200 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1 - 5
Methotrexate (Methotrexat Lachema - Lachema CZ)	30 mg/m ² i.v.	once daily on days 1 and 5

Filgrastim (Neupogen - Amgen Roche) 5-16 µg/kg s.c. in two divided doses (for the doses >5 µg/kg/day) daily to mobilize PBSC from day 7.

Table 3. Chemotherapy MINE used for mobilization.

Ifosfamide (Holoxan - Asta Medica)	1700 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1 - 3
Mitoxantrone (Refador - Spofa CZ)	10 mg/m ² i.v.	on day 1
Etoposide (Vepesid - Bristol - Myers Squibb)	175 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1 - 3

Filgrastim (Neupogen - Amgen Roche) 5-16 µg/kg s.c. in two divided doses (for the doses >5 µg/kg/day) daily from day 5 until aphereses are finished.

Table 4. Chemotherapy MINE used as salvage only.

Ifosfamide (Holoxan - Asta Medica)	1330 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1 - 3
Mitoxantrone (Refador - Spofa CZ)	8 mg/m ² i.v.	on day 1
Etoposide (Vepesid - Bristol - Myers Squibb)	65 mg/m ² i.v. infusion	once daily on days 1 - 3

have precise REAL classification for all NHL patients. Among the 32 NHL patients, there were 11 patients with diffuse large B-cell lymphoma, 5 patients with peripheral T-cell lymphoma, 5 patients with diffuse centroblastic-centrocytic lymphoma, 3 patients with centroblastic lymphoma, 2 patients with mantle cell lymphoma, 1 patient with immunoblastic lymphoma, 1 patient with centrocytic lymphoma, 2 patients with follicular lymphoma, and 2 patients with unclassified NHL.

In patients who received at least two courses of salvage chemotherapy the response was estimated according to published criteria (Cheson et al., 1999). For high dose therapy, we used standard BEAM or BuCy2 regimens in the majority of cases.

Chemotherapy VIM and MINE

Details are shown in tables 2, 3, and 4. Continuous hydration (250 ml per hour) and mesna (in 100% of ifosfamide dose) were started 3 hours prior to starting ifosfamide infusion. The higher dose of filgrastim (16 µg/kg/day) for mobilization was given only in highly pretreated patients (previous extensive radiotherapy and/or intensive polychemotherapy). According to the published data, MINE chemotherapy is not very myelotoxic (Rodriguez et al., 1995). Therefore, in an effort to improve the mobilizing capacity of MINE, we increased the doses of cytostatics in MINE chemotherapy used for mobilization.

Leukaphereses and cryoconservation

Aphereses began during recovery from myelosuppression when leukocytes exceeded at least 1×10^9 cells/l and the peripheral blood CD34⁺ cell count approached 20 cells per µl. Collections were performed with a COBE Spectra cell separator (software version 3.6, later 5.1) with collection pump speed 0.9 ml/min. We chose as the threshold for satisfactory harvest 5×10^6 CD34⁺ cells/kg (when achieved in one procedure, we collected at least 2.5×10^6 CD34⁺ cells/kg

in the second apheresis as a back-up). Usually, during one apheresis 2.5-3 total blood volumes of the patient were processed.

Cells were cryopreserved with a Sy-Lab Glacier device (SY-LAB, Austria) in a mixture of autologous plasma, Hank's balanced salt solution (without Ca and Mg; Sigma) and DMSO (Sigma; final concentration of 10%), and were stored in liquid nitrogen.

CD34⁺ cell estimation and CFU-GM assay

These analyses were performed as previously described (Mayer et al., 1999). However, from May 1999 until now, the number of CFU-GM has been evaluated in a routine colony-assay systems using complete methylcellulose-based medium MethoCult HCC-4434 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada). A sample of the leukapheresis product was diluted using heparinized (50 UI/ml) 4% human serum albumin in Hank's balanced salt solution (Sigma, St. Louis, USA) and analyzed for blood cell count. Volume containing 0.510^6 of white blood cells was then mixed with Iscoves's modified Dulbecco's medium (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) to get 0.5 ml of cell suspension. In the end, 3 ml of MethoCult medium HCC-4434 was well mixed with 0.3 ml of the cell suspension and plated in duplicate according to the manufacturer's instructions. CFU-GM colonies were scored after 14-16 days of incubation at 37° C in 5% CO₂ humidified atmosphere. Results were expressed as the number of CFU-GM in one ml of analyzed sample.

Results

Toxicity of VIM and MINE therapy

A total of 191 courses of salvage ifosfamide and etoposide-based regimens were administered, 116 courses of VIM (median 2 per patient; range 1 - 4) and 75 courses of MINE (median 3 per patient; range 1 - 4).

The tolerance of chemotherapy was excellent, side effects

Table 5a. Toxicity of VIM regimen (WHO scale) administered as a salvage only (n=66).

Toxicity	Hematologic - leukocytes	Hematologic - thrombocytes	Hematologic - hemorrhage	Gastrointestinal - liver enzymes	Gastrointestinal - oral	Gastrointestinal - nausea/vomiting	Gastrointestinal - diarrhea	Renal - hematuria	Others
Grade 0	47	57	66	54	64	43	65	58	One patient developed severe mucositis, one patients developed febrile neutropenia.
Grade 1	6	2	0	10	1	18	1	8	
Grade 2	8	3	0	2	0	5	0	0	
Grade 3	2	3	0	0	0	0	0	0	
Grade 4	3	1	0	0	1	0	0	0	
Median	0	0	0	0	0	0	0	0	
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	
Maximum	4	4	0	2	4	2	1	1	
Average	1	0	0	0	0	0	0	0	

Table 5b. Toxicity of VIM regimen (WHO scale) administered as a salvage and PBSC mobilization (n=50).

Toxicity	Hematologic - leukocytes	Hematologic - thrombocytes	Hematologic - hemorrhage	Gastrointestinal - liver enzymes	Gastrointestinal - oral	Gastrointestinal - nausea/vomiting	Gastrointestinal - diarrhea	Renal - hematuria	Others
Grade 0	30	18	48	30	46	28	50	39	Five patients (10%) needed platelet transfusions (1-5 units)
Grade 1	6	10	2	16	3	16	0	11	
Grade 2	3	9	0	3	0	4	0	0	
Grade 3	2	8	0	1	1	2	0	0	
Grade 4	9	5	0	0	0	0	0	0	
Median	0 ($4 \times 10^9/l$)	1 ($79.5 \times 10^9/l$)	0	0	0	0	0	0	
Minimum	0 ($14.4 \times 10^9/l$)	0 ($295 \times 10^9/l$)	0	0	0	0	0	0	
Maximum	4 ($0.04 \times 10^9/l$)	4 ($9 \times 10^9/l$)	1	3	3	3	0	1	
Average	0 ($4.39 \times 10^9/l$)	1 ($91.2 \times 10^9/l$)	0	1	0	1	0	0	

Table 5c. Toxicity of MINE regimen (WHO scale) administered as a salvage only (n=43).

Toxicity	Hematologic – leukocytes	Hematologic – thrombocytes	Hematologic – hemorrhage	Gastrointestinal – liver enzymes	Gastrointestinal – oral	Gastrointestinal – nausea/vomiting	Gastrointestinal – diarrhea	Renal – hematuria	Others
Grade 0	22	33	43	43	41	31	43	34	One patient developed febrile neutropenia.
Grade 1	5	6	0	0	1	8	0	9	
Grade 2	5	3	0	0	0	2	0	0	
Grade 3	6	1	0	0	1		0	0	
Grade 4	5	0	0	0	0	0	0	0	
Median	1	0	0	0	0	0	0	0	
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	
Maximum	4	3	0	0	3	3	0	1	
Average	2	0	0	0	0	0	0	0	

Table 5d. Toxicity of MINE regimen (WHO scale) administered as a salvage and PBSC mobilization (n=32).

Toxicity	Hematologic – leukocytes	Hematologic – thrombocytes	Hematologic – hemorrhage	Gastrointestinal – liver enzymes	Gastrointestinal – oral	Gastrointestinal – nausea/vomiting	Gastrointestinal – diarrhea	Renal – hematuria	Others
Grade 0	0	10	32	27	30	20	32	21	Five patients (16%) needed platelet transfusions (2-5 units)
Grade 1	4	3	0	5	1	6	0	11	
Grade 2	3	9	0	0	1	4	0	0	
Grade 3	9	9	0	0	0	2	0	0	
Grade 4	16	1	0	0	0	0	0	0	
Median	4 (1.0x10 ⁹ /l)	2 (69x10 ⁹ /l)	0	0	0	0	0	0	
Minimum	1 (3.45x10 ⁹ /l)	0 (148x10 ⁹ /l)	0	0	0	0	0	0	
Maximum	4 (0.09x10 ⁹ /l)	4 (23.5x10 ⁹ /l)	0	1	2	3	0	0	
Average	3 (1.31x10 ⁹ /l)	1 (75.6x10 ⁹ /l)	0	0	0	0	0	0	

were not serious. For better outcome of salvage therapy or when VIM and MINE failed, we administered a total of 51 courses of other regimens (mini-dexa-BEAM, DHAP). Detailed information concerning toxicity of MINE and VIM regimens are given in the tables 5a – 5d.

Outcome of VIM and MINE salvage therapy

There were 41 HD and 27 NHL patients who received at least two courses of MINE or VIM salvage chemotherapy, and in whom all necessary data were available for response evaluation. Administration of salvage VIM chemotherapy resulted in 56% of overall response rate in HD patients and the responses were as follows: CR 36%, partial remission (PR) 20%, stable disease 24%, and progressive disease 20%. For NHL patients, the administration of MINE chemotherapy resulted in 70% of overall response rate and the responses were as follows: CR 40%, PR 30%, stable disease 4%, and progressive disease 26%. We observed striking differences between subgroups of patients and the data are displayed in the table 6. The detailed analysis of efficacy and toxicity of further salvage regimens (mini-dexa-BEAM, DHAP) is beyond the scope of this article. Briefly, these regimens, administered as second salvage chemotherapy, have substantial toxicity and limited efficacy (Vášová et al., 1999).

Leukaphereses and yields

We performed 229 leukaphereses (median 3 per patient; range 1-7) in total. We did not collect at least 2.5x10⁶ CD34⁺ cells/kg in only 7 patients (9%), and the harvested amount of CD34⁺ cells was lower than 1.0x10⁶/kg in only 2 patients (2%).

In 50 HD patients primed with VIM + G-CSF, we started to collect PBSC between the days +11 and +19 (median: +13). In 44 from 50 patients (88%), the harvest started between the days +12 - +14, so the timing of aphereses using VIM was advantageously predictable. The mean collection yield was 10.6x10⁶ CD34⁺ cells/kg (range 0.3 - 38.8 x10⁶) and 53.1

x 10⁴ CFU-GM/kg (range 0.6 - 216.0 x10⁴). The dose of G-CSF used for mobilization was 5 µg/kg/day in 9 patients, 10 mg/kg/day in 29 patients, and 16 µg/kg/day in 12 patients.

We started to collect PBSC between days +10 and +15 (median: +12) in 32 NHL patients primed with MINE + G-CSF. In 26 from 32 patients (81%), the harvest started between the days +11 - +13. Again, the timing of aphereses using MINE was easily predictable. The mean collection yield was 12.5x10⁶ CD34⁺ cells/kg (range 0.8 - 48.1 x10⁶) and 51.5x10⁴ CFU-GM/kg (range 4.2 - 180.8 x10⁴). The dose of G-CSF used for mobilization was 5 µg/kg/day in 5 patients, 10 µg/kg/day in 25 patients, and 16 µg/kg/day in 2 patients.

Engraftment after high dose therapy

Forty-seven of 50 HD patients (94%) and 26 of 32 NHL patients (81%) were transplanted (BEAM – 54 times, BuCy2 – 15 times). The recovery of hematopoiesis was rapid in both groups of patients. Median time for reaching white blood cells > 1.0x10⁹/l was 10 days for both HD and NHL patients, and for thrombocytes > 50x10⁹/l 12 days for HD and 11 days for NHL patients, respectively.

Table 6. Response rates in subgroups of HD and NHL patients after VIM and MINE salvage chemotherapy.

Disease status before salvage therapy	Disease status after salvage therapy							
	VIM (Hodgkin's disease)				MINE (non-Hodgkin's lymphomas)			
	SD	PR	CR	Progression	SD	PR	CR	Progression
Progression	5/14 36%	2/14 14%	2/13 14%	5/14 36%	0/5 0%	1/5 20%	0/5 0%	4/5 80%
Relapse	4/25 16%	6/25 24%	12/25 48%	3/25 12%	0/11 0%	4/11 36%	6/11 55%	1/11 9%
D, PR	1/2 50%	-	1/2 50%	-	1/11 9%	3/11 27%	5/11 46%	2/11 18%

Discussion

Our data shows that VIM and MINE are effective regimens for therapy of relapsed or refractory lymphoma patients, have excellent PBSC mobilization capacity in a predictable time interval and are of low toxicity. Rodriguez et al. (1995) reported a response rate of 48% (CR 21%) in NHL patients treated with MINE. The main toxicity was myelosuppression, nephrotoxicity and neurotoxicity were also reported. Nowrousian et al. (1987) observed 34% CR and 43% PR in lymphoma patients treated with VIM±bleomycin. In 6% of patients, the authors observed stomatitis, and septic complications in 5%. The

response rate of MINE in the present study was 70% (CR 40%, PR 30%). We also observed myelosuppression as the main form of toxicity. The response rate to VIM was 56%; 36% CR, and 20% PR. As with MINE, myelosuppression was the dominant form of toxicity. We also observed urotoxicity, nausea, vomiting and occasionally a transient increase in serum SGOT/SGPT levels. Keeping in mind heterogeneity of patient populations in different reports it seems that our results concerning efficacy and toxicity of VIM and MINE regimens are comparable with those published previously. Several previous publications have demonstrated the PBSC

Table 7. Usage of lymphoma salvage chemotherapies as mobilizing regimens.

Study	Patients	Regimen	Collection	Toxicity
Olivieri et al., 1995	14 NHL and HD patients	DHAP + 5 µg/kg/day G-CSF	Start on days +11 - +18; 10 (1.1-162.3) x10 ⁴ /kg CFU-GM, 2.6 (0.2-18.3) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	Thrombocytopenia <20x10 ⁹ /l in 4 patients (28%).
Petit et al., 1999	22 NHL and HD patients	ESHAP + 5 µg/kg/day G-CSF	Start on days +12 - +19; 7.4 (0.78-50.9) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	Thrombocytopenia <25x10 ⁹ /l lasted 1 (0-8) days
Kröger et al., 1998	17 NHL and HD patients	Mini-dexa-BEAM + 5 µg/kg/day G-CSF	Start on days +13 - +21; 6 (0.8-90) x10 ⁴ /kg CFU-GM, 5.1 (0.3-24.8) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	Hospitalization 21 (18-24) days, i.v. antibiotics 6 (0-7) days, number of platelet transfusions 1 (1-2)
Fermé et al., 1994	30 relapsed or refractory HD patients	Mitoguazone, ifosfamide, vinorelbine, etoposide + 5 µg/kg/day GM-CSF	Start on days +11 - +22; sufficient graft in 20/23 patients (87%)	Grade 4 neutropenia 85%, grade 3-4 thrombocytopenia 53%, febrile neutropenia 32%
McQuaker et al., 1999	42 NHL and HD patients	IVE (ifosfamide, etoposide, epirubicin) + G-CSF 300 µg/day	6.78 (0.19-36) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	Not analyzed
Moskowitz et al., 1999	163 NHL patients	ICE (ifosfamide, carboplatin, etoposide) + G-CSF 10 µg/kg/day; collection started after the third ICE cycle. After previous two cycles, G-CSF 5 µg/kg/day was given.	In 91 of the 100 patients, who actually underwent PBSC harvest, the collection started on days +11 or +12. Collection: 8.4 (0.1-40) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	After the stimulation ICE, 10% and 36% of patients needed platelet and red blood cell transfusion, respectively
Donato et al., 1999	36 NHL patients	Ifosfamide total dose 10 g/m ² , etoposide total dose 900 mg/m ² + G-CSF 10 µg/kg/day.	Start on days +16 - +23; 13.1 (4.1-148) x10 ⁶ /kg CD34 ⁺	Thrombocytes on the day of the first collection: 38 (11-315) x10 ⁹ /l, 17% of patients developed febrile neutropenia
Present study	82 NHL and HD patients	VIM for HD and MINE for NHL patients + G-CSF 5-16 µg/kg/day (mainly 10 µg/kg/day).	In 85% of patients, collection started on median (13-VIM, 12-MINE) ±1 day. In only 9% of patients, at least 2.5x10 ⁶ /kg CD34 ⁺ cells were not collected, and in only 2% of patients at least 1x10 ⁶ /kg CD34 ⁺ cells were not collected.	Very low, see "Results"

Although there were not many studies published so far studying anti-tumor efficacy, toxicity, and stimulating capacity of ifosfamide-based salvage regimens, data summarized in table 6 show very encouraging results. Based on our experience we conclude that the VIM and MINE are well-tolerated regimens providing significant anti-lymphoma effect and low toxicity. VIM and MINE in combination with 5-16 µg/kg/day of filgrastim also provide good PBSC mobilizing capability in a predictable time interval. These regimens are also advantageous because of short-time leukopenia and mild thrombocytopenia, which is critical to ensure an uneventful apheresis. Compared with other regimens, VIM and MINE seems to offer multiple advantages.

mobilization capacity of salvage regimens; some regimens were rather toxic, however, while others failed to show sufficient mobilizing capacity. The poor predictability of the harvest window after mobilization chemotherapy observed in other studies presents logistic problems. Data from some reports are summarized in the table 7.

Acknowledgements

We thank colleagues from our department for the excellent care for patients, V. Hoffová and J. Čerňanská for cooperation with stem cell harvest, and J. Adler and D. Havranová for cooperation with progenitor cell counting and cryopreservation.

Literature

- Bosly A., Sonet A., Salles G., Brice P., Haioun C. et al.: Late intensification is superior to early intensification in relapsing/refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. A randomized study from the GELA: LNH RP 93. *Exp. Hematol.* 25, 1997, 732. Abstract No 16.
- Cabanillas F., Hagemester F.B., Bodcy G.P., Freireich E.J.: IMVP-16: an effective regimen for patients with lymphoma who have relapsed after initial combination chemotherapy. *Blood* 60, 1982, 693-697.
- Canellos G.P., Anderson J.R., Propert K.J., Nissen N., Cooper M.R. et al.: Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N. Engl. J. Med.* 327, 1992, 1478-1484.
- Carella A.M., Pollicardo N., Pungolino E., Frassoni F., Giordano D. et al.: Autologous stem cell transplantation as adjuvant treatment vs no further therapy for poor-risk Hodgkin's disease in first complete remission after MOPP/ABVD. *Leukemia Lymphoma* 15, 1995, Suppl. 1, 59-61.
- Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., Shipp M.A., Fisher R.I. et al.: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 1244-1253.
- Demirer T., Buckner C.D., Bensinger W.I.: Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 14, 1996, 106-116.
- Diehl V., Franklin J., Hasenclever D., Tesch H., Pfreundschuh M. et al.: BEACOPP, a new dose-escalated and accelerated regimen, is at least as effective as COPP/ABVD in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: interim report from a trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* 16, 1998, 3810-3821.
- Donato M.L., Champlin R.E., van Besien K.W., Korbling M., Cabanillas F. et al.: Intensive dose ifosfamide and etoposide with G-CSF for stem cell mobilization in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 35, 1999, 317-324.
- Ferné C., Brice P., Gabarre J., Diviné M., Detournignies L. et al.: MINE chemotherapy plus rhGM-CSF as salvage and peripheral blood progenitor cell mobilizing regimen for relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Blood* 84, 1994, Suppl. 1, Abstract No 635.
- Fisher R.I., Gaynor E.R., Dahlborg S., Oken M.M., Grogan T.M. et al.: Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 328, 1993, 1002-6.
- Gratwohl A., Passweg J., Baldomero H., Hermans J.: Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. *Bone Marrow Transpl.* 24, 1999, 231-245.
- Haioun C., Lepage E., Gisselbrecht C., Salles G., Coiffier B. et al.: Survival benefit of high dose therapy over sequential chemotherapy in poor risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Final analysis of the prospective LNH 87-2 protocol. A GELA study. *Blood* 94, 1999, Suppl. 1, Abstract No 2711.
- Horning S.J., Chao N.J., Negrin R.S., Hoppe R.T., Long G.D. et al.: High-dose therapy and autologous hematopoietic progenitor cell transplantation for recurrent or refractory Hodgkin's disease: analysis of the Stanford University results and prognostic indices. *Blood* 89, 1997, 801-813.
- Kröger N., Zeller W., Fehse N., Hassan H.T., Kröger W. et al.: Mobilizing peripheral blood stem cells with high-dose G-CSF alone is as effective as with Dexamethasone-BEAM plus G-CSF in lymphoma patients. *Brit. J. Haematol.* 102, 1998, 1101-1106.
- Longo D.L., Duffey P.L., Young R.C., Hubbard S.M., Ihde D.C. et al.: Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: the low probability for cure. *J. Clin. Oncol.* 10, 1992, 210-218.
- Mayer J., Kofístek Z., Vášová I., Vorlíček J., Vodvářka P.: Ifosfamide and etoposide-based chemotherapy as salvage and mobilizing regimens for poor prognosis lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 23, 1999, 413-419.
- McQuaker I.G., Haynes A.P., Stainer C., Byrne J.L., Russel N.H.: Mobilisation of peripheral stem cells with IVE and G-CSF improves CD34+ yields and engraftment in patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Bone Marrow Transpl.* 24, 1999, 715-722.
- Mills W., Chopra R., McMillan A., Pearce R., Linch D.C., Goldstone A.H.: BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 13, 1995, 588-595.
- Moskowitz C.G., Bertino J.R., Glassman J.R., Hedrick E.E., Hunte S. et al.: Ifosfamide, carboplatin, and etoposide: a highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 3776-3785.
- Nowrousian M.R., Schoetensack B., Pfeiffer R., Niederle N., Anders C. et al.: Combination chemotherapy with etoposide (VP-16), ifosfamide, methotrexate, and bleomycin (VIM(B)) for refractory or recurrent lymphomas. *Contr. Oncol.* 26, 1987, 414-422.
- Öliveri A., Offidani M., Ciniero L., Cantori L., Ombrosi L. et al.: DHAP regimen plus G-CSF as salvage therapy and priming for blood progenitor cell collection in patients with poor prognosis lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 16, 1995, 85-93.
- Petit J., Boqué C., Cancelas J.-A., Sarrá J., Muñoz J. et al.: Feasibility of ESHAP + G-CSF as peripheral blood hematopoietic progenitor cell mobilisation regimen in resistant and relapsed lymphoma: a single-center study of 22 patients. *Leuk. Lymphoma* 34, 1999, 119-127.
- Philip T., Guglielmi C., Hagenbeek A., Somers R., van der Lelie H. et al.: Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 333, 1995, 1540-1545.
- Phillips G.L., Reece D.E., Wolf S.N., Goldie J.H.: The use of conventional salvage chemotherapy before dose-intensive cytotoxic therapy and autologous transplantation for aggressive-histology lymphoma: a case for re-evaluation. *Leukemia Lymphoma* 26, 1997, 507-513.
- Prince H.M., Imrie K., Crump M., Stewart A.K., Girouard C. 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. *Brit. J. Haematol.* 92, 1996, 880-889.
- Rodriguez M.A., Cabanillas F.C., Hagemester F.B., McLaughlin P., Romaguera J.E. et al.: A phase II trial of mesna/ifosfamide, mitoxantrone and etoposide for refractory lymphomas. *Ann. Oncol.* 6, 1995, 609-611.
- Salles G., Shipp M.A., Coiffier B.: Chemotherapy of non-Hodgkin's aggressive lymphomas. *Semin. Hematol.* 31, 1994, 46-69.
- Schmitz N., Sextro M., Pfistner B., Hasenclever D., Tesch H. et al.: High-dose therapy followed by hematopoietic stem cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: final results of a randomized GHSG and EBMT trial (HD-R1). *Proc. ASCO* 18, 1999, Abstract No 5.
- Smith T.J., Hillner B.E., Schmitz N., Linch D.C., Dreger P. et al.: Economic analysis of a randomized clinical trial to compare filgrastim-mobilized peripheral-blood progenitor-cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 15, 1997, 5-10.
- Sweetenham J.W., Carella A.M., Taghipour G., Cunningham D., Marcus R. et al.: High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation for adult patients with Hodgkin's disease who do not enter remission after induction chemotherapy: results in 175 patients reported to the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 3101-3109.
- Vášová I., Navrátil M., Mayer J. et al.: Mini(dexa)BEAM jako konvenčně dávkovaná záchranná chemoterapie druhé řady v léčbě relabujících a rezistentních lymfomů. XII. český a slovenský hematologický a transfuziologický sjezd s mezinárodní účastí, Olomouc, 1.-4. 9. 1999, abstrakt č. P19, posílám náš příspěvek do Klinické onkologie po akceptování všech drobných připomínek recenzenta, spolu s disketou.

HODNOCENÍ MUKOSITIDY U PACIENTŮ LÉČENÝCH VYSOKODÁVKOVANOU CHEMOTERAPIÍ S PODPOROU AUTOLOGNÍCH KRVETVORNÝCH BUNĚK A JEHO VÝZNAM PRO ODHAD PERORÁLNÍHO PŘÍJMU A DALŠÍCH FAKTORŮ MORBIDITY A MORTALITY

THE EVALUATION OF MUCOSITIS IN PATIENTS TREATED WITH HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY WITH AUTOLOGOUS STEM CELL SUPPORT AND ITS ROLE IN EVALUATION OF ORAL INTAKE AND OTHER FACTORS OF MORBIDITY AND MORTALITY

PYTLÍK R.¹⁾, BENEŠ P.²⁾, GREGORA E.¹⁾, PAŤORKOVÁ M.¹⁾, CHOCENSKÁ E.³⁾, PROCHÁZKA B.⁴⁾, KOZÁK T.¹⁾

¹⁾ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE KRÁLOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

²⁾II. INTERNÍ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE KRÁLOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

³⁾ODDĚLENÍ KLINICKÉ VÝŽIVY, FAKULTNÍ NEMOCNICE KRÁLOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

⁴⁾ODDĚLENÍ BIOMEDICÍNY A STATISTIKY, STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

Souhrn: *Východiska:* MUCPEAK je snadný skórovací systém pro hodnocení ústní mukositivity. Vysoké skóre MUCPEAK koreluje s rizikem bakterémie a peritransplantační mortality u pacientů léčených autologní či alogenní transplantací. Korelace MUCPEAK s orálním příjmem a ostatními parametry mukositivity nebyla dosud prospektivně hodnocena. *Metody:* V letech 1999 až 2000 byl sledován průběh mukositivity trávicího traktu u 21 autologně transplantovaných pacientů. Skóre MUCPEAK, neasea, zvracení, průjmy, krevní obraz a perorální příjem byly hodnoceny denně. Spearmanovy korelační koeficienty a Mantel-Haenszel chí-kvadrát testy byly použity ke statistickému hodnocení. *Výsledky:* MUCPEAK signifikantně negativně koreloval s perorálním příjmem a s absolutním počtem neutrofilů, nauseou a zvracením. Skóre MUCPEAK >10 nebo >12; nebo ANC <500 a <1000/mm³ mohou být použity k předpovědi neadekvátního perorálního příjmu (odds ratios 5,88, 7,69, 5,34 a 5,42; p = 0,000003, 0,001, <0,000001 a <0,000001). Počet dní se skóre MUCPEAK >12 signifikantně koreloval s délkou hospitalizace po infuzi krevetvorných buněk. Pacienti s peritransplantační febrilní neutropenií měli těžší mukositivity než pacienti, kteří nebyli febrilní a začátek horečky silně koreloval se skóre MUCPEAK. Spotřeba krevních derivátů však nebyla tíží mukositivity ovlivněna. *Závěr:* MUCPEAK je spolehlivý nástroj k předpovědi adekvátního perorálního příjmu, pravděpodobnosti febrilní a délky hospitalizace u pacientů léčených autologní transplantací. Skóre MUCPEAK >10 nebo >12 nebo ANC <500 a <1000 předpovídají vysoké riziko neadekvátního perorálního příjmu a mohou být použity k identifikaci kandidátů nutriční intervence.

Klíčová slova: autologní, transplantace, periferní progenitorové buňky, chemoterapie, mukositis, nutriční, neutropenie

Abstract: *Background:* MUCPEAK is a simple scoring system for evaluation of oral mucositis. High scores of MUCPEAK has been shown to predict the risk of bacteremia and peritransplant mortality in recipients of autologous or allogeneic progenitor blood cell transplants. However, its correlation with oral intake and other factors of mucositis has not been evaluated prospectively. *Methods:* From September 1999 to September 2000, 21 ASCT patients were evaluated for signs of GIT mucositis. MUCPEAK, nausea, vomiting, diarrhoe, full blood counts and oral intake were evaluated daily; as adequate oral intake was taken $\geq 50\%$ of 1.25x resting energy expenditure (REE). Spearman correlation coefficients and Mantel-Haenszel chi-square tests were used. *Results:* MUCPEAK showed significant negative correlation with oral intake ($r = -0.36$, $p = 0.0003$). However, oral intake correlated significantly also with absolute neutrophil count (ANC, $r = 0.37$, $p = 0.00003$), and nausea/vomiting ($r = -0.34$, $p = 0.0001$) with strong correlation also between MUCPEAK and ANC ($r = -0.56$, $p < 0.00001$). The correlation of MUCPEAK and nausea/vomiting was of much less significance ($r = 0.2$, $p = 0.01$). MUCPEAK score >10 or >12; or ANC <500 or <1000/mm³ could all be used as powerful predictors of inadequate oral intake on a given day (odds ratios 5.88, 7.69, 5.34 and 5.42; $p = 0.000003$, 0.001, <0.000001 and <0.000001). Number of days with MUCPEAK >12 correlated significantly with length of hospitalization after PBPC infusion ($r = 0.471$, $p = 0.05$). Patients with peritransplant febrile episodes had more severe mucositis than patients who did not become febrile (maximum MUCPEAK 13.8 v. 11.4, $p < 0.001$) and onset of fever correlated strongly with MUCPEAK score ($p = 0.007$). However, consumption of blood products was not dependent on severity of mucositis. *Conclusion:* MUCPEAK is a powerful predictor of adequacy of oral nutritional intake, probability of infection and length of hospitalization in ASCT patients. MUCPEAK is strongly dependent of ANC count but only modestly correlates with other signs of GIT mucositis. MUCPEAK score of >10 or >12 and ANC <500 or <1000 predict an inadequate oral intake on a given day and can be used for identification of candidates for nutritional intervention.

Key words: autologous, transplantation, peripheral progenitor cells, chemotherapy, mucositis, nutrition, neutropenia

Úvod

Sliznice úst a trávicího traktu je tvořena populací buněk s rychlou obměnou a patří proto vedle kostní dřeně k tkáním nejvíce poškozeným chemo a radioterapií pro nádorová onemocnění (1). Incidence a tíže mukositivity je závislá na druhu, dávce a způsobu podání cytostatik, jejich vzájemné kombinaci

a současném či následném užití radioterapie (2). Zatímco u standardní chemoterapie se incidence mukositivity pohybuje zhruba v rozmezí 12-40% (2-4), při vysokodávkované léčbě s podporou autologních či alogenních krevetvorných buněk (ASCT, alloSCT) dosahuje kolem 75% (4-6) a při použití cílené, frakcionované radioterapie na oblast hlavy a krku 92-100%

(6, 7). Právě vzhledem k možnosti obejít hematologickou toxicitu profinádorové léčby pomocí infuze auto či alloSCT se mukositida často stává limitující toxicitou (8). Mukositida způsobuje jednak subjektivní dyskomfort pacienta (bolesti dutiny ústní, neaseu, průjmy), jednak omezení perorálního příjmu a nutnost podpůrné či úplné parenterální hydratace a výživy, rovněž zvyšuje riziko endogenních infekcí (9, 10) a ovlivňuje frekvenci a délku hospitalizace.

I přes dobrou přístupnost dutiny ústní jako reprezentativní součásti trávicího traktu neexistuje jednotný systém hodnocení slizničních změn. V polovině devadesátých let byla publikována databáze studií hodnotících chemoterapií indukovanou mukositudu: v 81 studiích bylo použito celkem 14 skórovacích systémů (11). Tyto systémy lze rozdělit do několika skupin. První skupinu tvoří jednoduché a snadno uplatnitelné systémy semikvantitativně hodnotící buď převážně vzhled sliznic (12) nebo bolest a schopnost polykání (13), případně kombinaci obou (14, 15). Poslední dva citované systémy jsou hojně užívané vzhledem k jejich adopci mezinárodními organizacemi (WHO, resp. RTOG a EORTC). Jejich výhodou je snadné použití, nevýhodou pak špatná inter a intraobservační shoda. Druhou skupinu tvoří propracované systémy založené na měření velikosti, resp. povrchu slizničních lezí a jiných objektivních znaků a kalkulaci výsledného indexu (4, 5, 16). Jejich výhodou je dobrá inter a intraobservační shoda a možnost použití v přísně kontrolovaných studiích, nevýhodou pak pracnost, pro niž se nehodí do každodenní praxe. Třetí skupinu tvoří systémy vyvinuté především pro ošetřovatelskou praxi a kombinující snadno hodnotitelné subjektivní a objektivní znaky (17, 18). Problémem je často náhodný výběr kritérií (např. odmítání kořeněných pokrmů a nutnost podávání opiatových analgetik) a jejich násilné spojování do jednoho skórovacího systému. Čtvrtá skupina, zkoumající změny sliznice pomocí in vitro studií (zralost a vitalita epitelových buněk) je omezena jen na ojedinělé studie (19). Žádný z uvedených systémů sledování mukositidy přitom nebyl shledán lepší než ostatní. V rámci grantu IGA 5502-3 probíhá na Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady (OKH FNKV) studie vlivu suplementace parenterálním glutaminem na rekonvalescenci pacientů po vysokodávkované léčbě s ASCT. Součástí této studie je i ověřování validity jednoho ze systémů hodnocení ústní mukositidy, tzv. Nebraska Oral Assessment Score (MUCPEAK) a jeho korelace s perorálním příjmem a parametry postižení dolního trávicího traktu. Uvedený systém byl vybrán především pro relativní snadnost použití, kombinaci převážně objektivních a snadno hodnotitelných kritérií a klinickou validitu prokázanou rozsáhlou studií na více než dvou stech pacientů (20). V tomto článku předkládáme první výsledky získané za pomoci tohoto skórovacího systému.

Pacienti a metody

Pacienti

Od září 1999 do září 2000 bylo zahrnuto 21 pacientů do randomizované, dvojité slepé studie vlivu podávání parenterálního glutaminu na rekonvalescenci pacientů po autologní transplantaci periferních kmenových buněk. Zahrnutí do studie mohli být všichni pacienti léčení autologní transplantací krvinek na OKH FNKV s výjimkou pacientů transplantovaných z kostní dřeně s přidávkou méně než 1×10^6 /kg CD34+ buněk z periferie; pacientek s karcinomem ovaria léčených vysokodávkovaným paclitaxelem s karboplatinou; pacientů s nedostačnou funkcí ledvin (vstupní kreatinin přes 176 μ mol/l) nebo v metabolické acidóze a pacientů zahrnutých v jiných klinických studiích, které vylučovaly randomizaci mezi glutaminem a placebem. Vstupní charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tabulce 1. Podmínkou účasti byl podpis informovaného souhlasu, schváleného místní etickou komisí.

Grantová studie IGA 5502-3

Pacienti byli randomizováni buď k podávání glutaminu (dipep-

Tabulka 1 - Charakteristika souboru

Počet hodnocených pacientů	21
Věk (medián, rozmezí)	53 (25-65)
Muži: ženy (počet, procenta)	13:8 (62%:38%)
Diagnózy (počet, procenta)	
Hodgkinův lymfom	1 (5%)
Non-Hodgkinův lymfom	5 (24%)
Mnohočetný myelom	7 (32%)
Chronická lymfatická leukémie	2 (10%)
Karcinom prsu	2 (10%)
Roztroušená skleróza	3 (14%)
Nádor. duplicita (ca prsu a non-Hodgkin. lymfom)	1 (5%)
Přípravné režimy* (počet, procenta)	
BEAM	10 (48%)
HD-Melfalan	7 (33%)
HD-ICE	3 (14%)
HD-Cyklofosfamid	1 (5%)
Počet podaných CD34 + buněk (medián, rozmezí - $CD34 \times 10^6$ /kg)	3.47 (1.21-7.06)
Příhojení (medián, rozmezí - den po převodu)	
V leukocytech nad 500/mm ³	10 (8-14)
V leukocytech nad 1500/mm ³	11 (9-14)
V ANC nad 500/mm ³	11 (9-13)
V trombocytech nad 20 tis/mm ³	11 (8-29)
V trombocytech nad 50 tis/mm ³	13.5 (9-33)
Počet dní s ANC pod 100 (medián, rozmezí)	4.5 (0-8)
Počet dní s ANC pod 500 (medián, rozmezí)	6 (3-10)
Dimise (medián, rozmezí - den po převodu)	12 (9-20)
Febrilní : afebrilní (počet pacientů, procenta)	11:9 (55%:45%)
Dny podávání růstových faktorů (medián, rozmezí)	5 (0-7)
Počet dní na parenterálních antibioticích (medián, rozmezí)	5 (0-18)
Počet podaných erytrocytových náplavů (medián, rozmezí)	2 (0-6)
Počet podaných trombokonzentratových jednotek** (medián, rozmezí)	1 (0-5)

*) BEAM = BCNU 300 mg/m², Etoposid 800 mg/m², Ara-C 800-1600 mg/m², Melfalan 140 mg/m²; HD-Melfalan = Melfalan 200 mg/m²; HD-ICE = Ifosfamid 12-16 g/m², Cykloplatin 18AUC, Etoposid 1 200 mg/m², HD-Cyklofosfamid = Cyklofosfamid 200 mg/kg.

**) Jedna trombokonzentratová jednotka představuje buď podání jednoho trombokonzentratu ze separátoru (standardní množství trombocytů $2-4 \times 10^{11}$) nebo 4-8 trombonáplavů z buffy coatu (standardní množství trombocytů 5×10^{10} v jednom trombonáplavu).

Tabulka 2 - Nebraska Oral Assessment Score (MUCPEAK)

Parametr	1 bod	2 body	3 body
Kvalita hlasu	Normální	Hluboký nebo chraptivý	Mluvení obtížné či bolestivé
Rty	Hladké, vlhké, růžové	Suché nebo popraskané	Vždy nebo krvácení
Jazyk	Růžový, vlhký, s papilami, vyhlazený	Povleklý, bez papil nebo zarudlý	Afty nebo rozpraskaný
Sliny*)	Běžného vzhledu	Husté	Žádné
Sliznice	Růžové, vlhké	Zarudlé či povleklé bez aft	Afty s krvácením či bez krvácení
Dásně	Pevné, růžové	Oteklé, se zarudnutím či bez něj	Spontánní krvácení či krvácení při dotyku *)
Zuby	Čisté, bez povlaku	Místy povlak	Generalizovaný povlak

*) Zkouší se ústní lopatkou

tid alanyl-L-glutamin; Dipeptiven fy Fresenius-Kabi) v dávce 30 g dipeptida, tj. 20 g glutaminu denně nebo k podání placeba (běžná aminokyselinová směs o stejném obsahu dusíku). Placebo či Dipeptiven byly podávány v 900 ml fyziologického roztoku po dobu 8 h ode dne +1 po převodu krvinek do propuštění, nejvýš však po dobu 14 dnů. V době publikace této práce studie stále probíhá a nebyla odslepena.

Denní sledování zahrnovalo stanovení orálního skóre mukositis MUCPEAK (tabulka 2) školenou transplantační sestrou a kvalitativní sledování parametrů mukositisy ostatních částí trávicího traktu: neústa, zvracení a průjemy. Ze skóre MUCPEAK byly dále vypočítávány následující indexy:

MUKMAX - maximální mukositis dosažená u konkrétního pacienta.

MUK9-13 – počet dní s mukosidou skóre stejného či vyššího než uvedené číslo.

MUK1-10 - součet skóre mukositis ve dnech 1-10. Jestliže pacient byl propuštěn před dnem 10, z předchozích dnů byl vypočten průměr a získané číslo bylo přičteno tolikrát, kolik dnů chybělo do dne 10.

MUKPRU1 - průměr mukositud ze dní od počátku hospitalizace do dne + 10. Byl-li pacient propuštěn dříve, počítal se průměr pouze za dny hospitalizace.

MUKPRU2 - průměr mukositud ze dní do počátku hospitalizace do propuštění. Liší se od MUKPRU1 pouze tehdy, jestliže pacient odešel domů později než den 10.

Denně bylo prováděno stanovení krevního obrazu a absolutního počtu neutrofilů (ANC). Sledování perorálního příjmu bylo prováděno denně kvalifikovanou dietní sestrou a přepočít na kilokalorie byl prováděn pomocí software „Progana“ a „Diety“ fy Ostrasoft. Adekvátnost příjmu byla hodnocena podle klidového energetického výdeje měřeného indirektním kalorimetrem V-Max fy Senzormedics, USA (mREE) a udávána v následujících indexech:

OE – perorální příjem uvedený v procentech, kdy 1.25xmREE = 100 %.

OE50 – vyjadřuje adekvátní či neadekvátní perorální příjem; přičemž za adekvátní je pokládán perorální příjem více než 50 % 1.25-násobku klidového energetického výdeje (mREE). Index nabývá hodnot 0 (příjem < 50 % 1.25xmREE) nebo 1 (příjem alespoň 50 % 1.25xmREE).

Parenterální výživa v dávce 26.5 kcal/kg a 1 g bílkovin/kg byla nasazována u pacientů, kteří neměli adekvátní perorální příjem po dobu 5 dnů a vysazována po 2 dnech, kdy perorální příjem překročil 50 % 1.25-násobku mREE. U pacientů s BMI nad 27 kg/m² byl parenterální příjem upravován tak, aby pacienti dostávali 34 kcal/kg LBM a 1,3 g bílkovin/kg LBM.

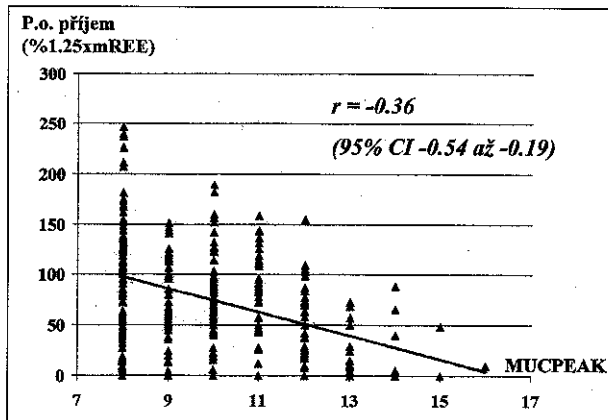
Pacienti dostávali perorálně profylakticky ciprofloxacín 2x500 mg, fluconazol 100 mg a valacyklovir 2x500 mg ode dne 0 nebo ode dne, kdy ANC poklesl pod $0.5 \times 10^9 / l$. Při vzestupu teploty nad 38°C axilárně byla odebrána hemokultura a podána empirická širokospektrá antibiotika dle nedávno publikovaného protokolu OKH FNKV (21).

Statistické zpracování

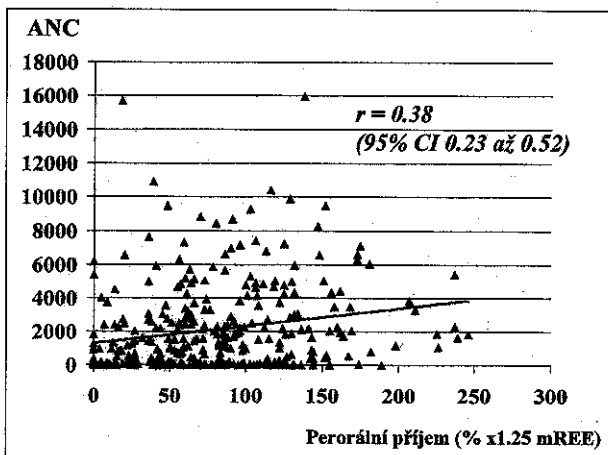
Korelace mezi neparаметrickými proměnnými byly hodnoceny pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. U veličin s opakovaným měřením u každé osoby (mukositida, orální příjem, ANC aj.) byly vypočteny zvlášť korelace pro každého jedince a pak byla testována nulovost průměrné korelace. Při srovnávání dvou souborů byl použit Studentův t-test a Wilcoxonův test. Indexy MUK<9, MUK<11, MUK<12 a MUK<14 byly srovnávány pomocí Mantel-Hanenszelova chí-dvadrát testu s parametrem OE<50 a se stratifikací podle osob. Odds ratio bylo vypočítáno pomocí Mantel-Hanenszelova váženého křížového poměru a 95% meze jeho spolehlivosti metodou podle Robince, Greenlanda a Breslawa. Stejná metodika byla uplatněna při srovnání parametru OE50 byl srovnáván se dny, kdy absolutní počet neutrofilů byl ≤100, ≤200, ≤500 a ≤1000.

Korelace byla hodnocena jako statisticky signifikantní ($p \leq 0,05$) a semikvantitativně jako nevýrazná ($r = 0$ až 0,25 nebo 0 až 0,25), středně výrazná ($r = 0,26$ až 0,5 nebo $-0,26$ až $-0,5$), výrazná ($r = 0,51$ až 0,75 nebo $-0,51$ až $-0,75$) a velmi výrazná ($r = 0,76$ až 1 nebo $-0,76$ až -1). Determinační koeficient r^2 byl vypočítán ke zjištění stupně podmíněnosti jedné veličiny veličinou druhou.

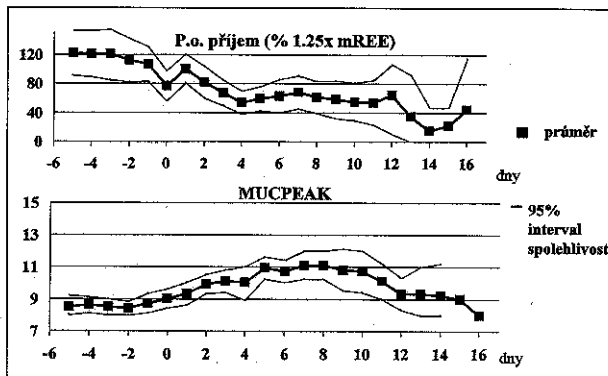
Obr. 1 – Perorální příjem a mukositis



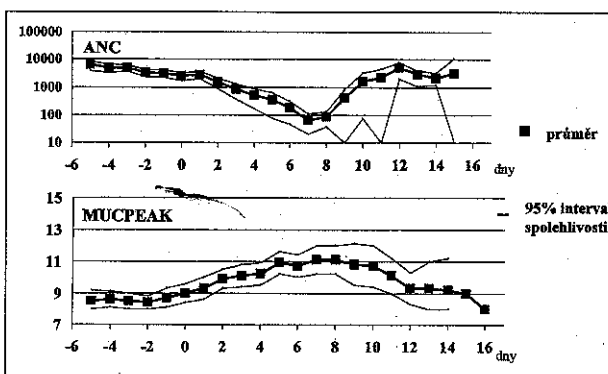
Obr. 2 – Perorální příjem a ANC



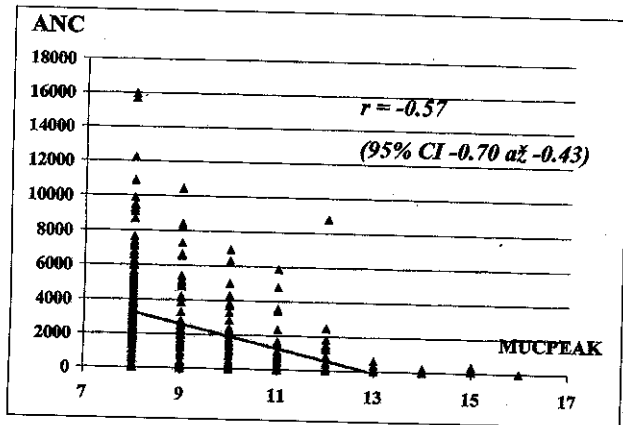
Obr. 3 – Perorální příjem a mukositis v časovém průběhu



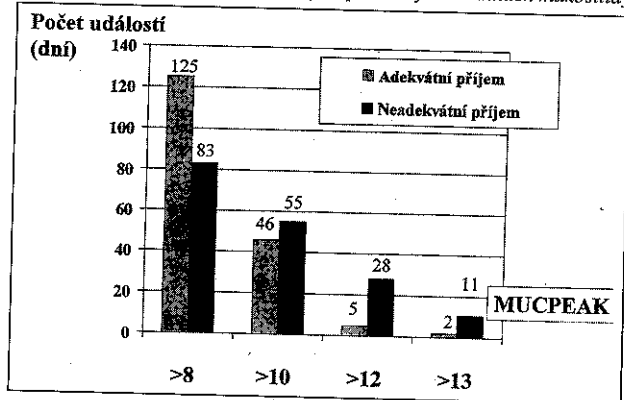
Obr. 4 – ANC a mukositis v časovém průběhu



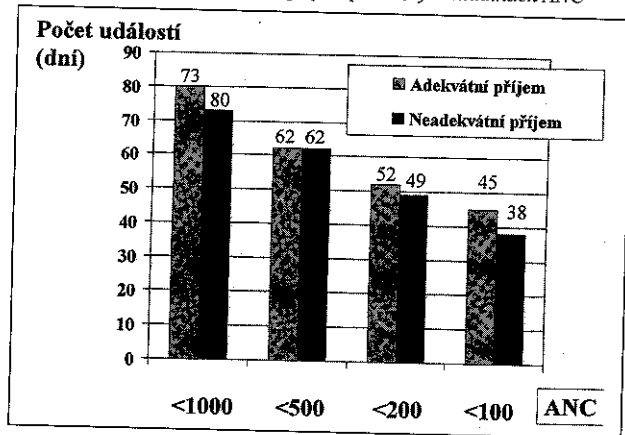
Obr. 5 – ANC a MUCPEAK



Obr. 6 – Riziko nedostatečného příjmu při různých hladinách mukositidy



Obr. 7 – Riziko nedostatečného příjmu při různých hladinách ANC



Výsledky

Korelace perorálního příjmu s jednotlivými parametry mukositidy a ANC.

Byla zjištěna středně výrazná, statisticky signifikantní negativní korelace ($r = -0.36$, $p = 0.0003$) mezi perorálním příjmem vyjádřeným jako OE a skóre mukositidy MUCPEAK (obr. 1). Obdobná negativní korelace byla zjištěna též mezi OE a naušou ($r = -0.34$, $p = 0.002$) a OE a zvracením ($r = -0.34$, $p = 0.0001$). Středně výrazná, statisticky signifikantní korelace byla nalezena mezi počtem neutrofilů ANC a OE ($r = 0.38$, $p = 0.00003$) (obr. 2). Korelace mezi mukositidou a orálním příjmem, stejně jako korelace mezi orálním příjmem a počtem neutrofilů jsou dobře patrné i na časové ose, uvádějící průměrné hodnoty těchto parametrů během jednotlivých dnů peritransplantačního období (obr. 3 a 4; den 0 = den infuze progenitorových buněk).

Tabulka 3 - průměrné korelace sledovaných parametrů mukositidy

	Průměrná korelace	Hladina statistické významnosti
Prům-nausea	0.34	$p = 0.002$
Prům - zvracení	0.30	$p = 0.01$
Nausea - zvracení	0.49	$p < 0.00001$
MUCPEAK - nausea	0.20	$p = 0.01$
MUCPEAK - zvracení	0.17	$p = 0.06$
MUCPEAK - průmjy	0.31	$p = 0.004$

Tabulka 4 - předpověď neadekvátního perorálního příjmu (OE<50) na základě MUCPEAK a ANC

	Odds ratio	95% meze spolehlivosti	Hladina statistické významnosti
MUCPEAK			
Více než 8	3.22	1.49-7.14	$p = 0.002$
Více než 10	5.88	2.7-12.5	$p < 0.00001$
Více než 12	7.69	2.17-25	$p = 0.001$
Více než 13	25	do ní hranice 2.17 horní hranice nelze	$p = 0.01$
ANC			
Méně než 100	3.0	1.44-6.22	$p = 0.004$
Méně než 200	3.88	1.97-7.65	$p = 0.00004$
Méně než 500	5.34	2.67-10.67	$p < 0.00001$
Méně než 1000	5.42	2.76-10.64	$p < 0.00001$

Tabulka 5 - korelace indexů mukositidy s dobou hospitalizace po převodu progenitorových buněk

	Bez zahrnutí pacientů hosp. na ARO		Se zahrnutím pacientů hosp. na ARO*)	
	Prům. korelace	p =	Prům. korelace	p =
MUKMAX	0.518	0.028	0.460	0.041
MUK1-10	0.503	0.033	0.593	0.006
MUK13	0.471	0.05	0.442	0.05
MUKPRU1	0.412	0.09	0.488	0.03
MUKPRU2	0.284	0.253	0.396	0.08

*)K vyloučení neúměrně velké chyby odhadu byla doba hospitalizace u pacientů překládaných na ARO arbitrárně stanovena na 25 dní.

Tabulka 6 - korelace indexů mukositidy s věkem

	Průměrná korelace	Hladina statistické významnosti
MUKMAX	0.48	$p = 0.03$
MUK1-10	0.38	$p = 0.1$
MUK13	0.46	$p = 0.04$
MUKPRU1	0.50	$p = 0.02$
MUKPRU2	0.48	$p = 0.05$

Korelace jednotlivých parametrů mukositidy mezi sebou navzájem a s ANC

Jednotlivé parametry mukositidy spolu vesměs statisticky signifikantně korelovaly na nevýrazné či středně výrazné úrovni (tab. 3). Výjimku tvoří korelace MUCPEAK se zvracením, která nedosáhla statistické významnosti ($p = 0.06$) a korelace nausea a zvracení, podle očekávání středně výrazná a statisticky signifikantní ($r = 0.49$, $p < 0.00001$). Potvrdili jsme rovněž očekávanou negativní korelaci mezi mukositidou a absolutním počtem neutrofilů (ANC) – tato korelace byla výrazná a statisticky signifikantní ($r = -0.57$, $p < 0.00001$, obr. 5), ale dle determinačního koeficientu r^2 je mukositida podmíněna počtem neutrofilů pouze z 32% ($r^2 = 0.32$) a z 68% tedy jinými faktory.

Tabulka 7 – Korelace mukositivity s ostatními parametry pro soubory prvních 12 a prvních 21 pacientů

	Prvních 12 pacientů		Všech 21 pacientů	
	Korelační koeficient	95% interval spolehlivosti	Korelační koeficient	95% interval spolehlivosti
Perorální příjem v. MUCPEAK	- 0.34 až -0.08	-0.6 až -0.19	- 0.36	-0.54
Perorální příjem v. ANC	0.35 až 0.61	0.09 až 0.52	0.38	0.22
MUCPEAK v. ANC	- 0.55 až -0.31	-0.78 až -0.43	- 0.57	-0.70
MUCPEAK v. nausea	0.24 až 0.42	0.06 až 0.36	0.21	0.05
MUCPEAK v. zvracení	0.16 až 0.38	-0.06 až 0.37	0.18	-0.01
MUCPEAK v. průjmy	0.24 až 0.56	-0.08 až 0.51	0.31	0.11
nausea v. zvracení	0.32 až 0.56	0.07 až 0.63	0.49	0.34
nausea v. příjem	0.33 až 0.58	0.08 až 0.53	0.34	0.15

Předpověď adekvátního příjmu na základě aktuálních hodnot MUCPEAK a ANC

Riziko neadekvátního perorálního příjmu (odds ratio) stouplalo s indexem mukositivity, takže bylo zhruba 3x větší u pacientů se skóre mukositivity MUCPEAK nad 8, 6x větší u pacientů s MUCPEAK nad 10, 8x větší u pacientů s MUCPEAK nad 12 a 25x větší u pacientů s MUCPEAK nad 13 oproti pacientům se skóre MUCPEAK pod těmito hodnotami. Statistická významnost však byla největší u pacientů s mukositivitou nad 10, u vyšších skóre mukositivity byly široké intervaly spolehlivosti ovlivněné nízkým počtem pozorovaných událostí, tj. dní, kdy pacienti mají mukositivitu uvedené tíže či horší (tab. 4, obr. 6).

Riziko neadekvátního perorálního příjmu (odds ratio) rovněž vzrostlo s poklesem neutrofilů pod 1000. Toto riziko bylo zhruba 5 až 5.5krát větší u pacientů s ANC pod 1000 a pod 500, 4x větší u pacientů s ANC pod 200 a 3x větší u pacientů s ANC pod 100 než u pacientů s ANC nad uvedenými hodnotami. Statistická významnost zde klesala od ANC 500 níže, což bylo spíše než nízkým počtem pozorovaných událostí způsobeno výrazným ovlivněním perorálního příjmu jinými faktory (tab. 4, obr. 7).

Korelace mukositivity s ostatními klinickými parametry.

Několik indexů mukositivity (nejvyšší dosažené skóre MUCPEAK, součet mukositivity ve dnech 1-10 a počet dní s mukositivou nad 12) statisticky signifikantně a středně výrazně až výrazně korelovalo s počtem dní do propuštění pacienta (tab. 5). Nalezena byla rovněž pozitivní, výrazná korelace nejvyššího dosaženého skóre mukositivity a počtu dní s mukositivou nad 12 s věkem; starší pacienti tedy měli sklon k těžší mukositidě (tab. 6). Mukositida ve dnech, kdy pacientům začala jejich první febrilní epizoda, byla větší než průměrné skóre mukositivity ode dne +1 do propuštění (průměr MUCPEAK pro začátek febrilní epizody 11.2 versus MUCPEAK 9.8 pro ostatní dny; $p = 0.003$). Naopak se nepodařilo zjistit vliv mukositivity na spotřebu krevních derivátů - trombonáplavů a erymas. Vzhledem k malému počtu událostí nebylo možno zjistit vliv mukositivity na incidenci bakteriemií a život ohrožujících komplikací - korelace výše zmíněných indexů mukositivity s počtem dnů do propuštění pacienta byla sice výraznější po zahrnutí dvou pacientů vyžadujících asistovanou ventilaci, avšak je nutno vzít do úvahy, že po překladu těchto pacientů na anesteziologicko-resuscitační oddělení již nebylo možno mukositivitu dobře sledovat (tab. 5).

Diskuse

Naše studie prokázala význam sledování slizničních změn u pacientů léčených autologní transplantací. Pacienti s vyšším skóre mukositivity MUCPEAK měli vyšší riziko neadekvátního perorálního příjmu, vyšší riziko febrilní neutropenie a delší dobu hospitalizace po převodu periferních progenitorových buněk. Ranní stanovení skóre mukositivity umožňuje předpovědět riziko neadekvátního perorálního příjmu v ten který den průběhu autologní transplantace a vytipovat tak kandidáty nutriční intervence.

Námi používané skóre mukositivity bylo jednoduché a snadno použitelné. Transplantační sestry se rychle zacvičily v jeho používání a vlastní hodnocení zahrnuje 1-2 minuty času u lůžka pacienta - slizniční změny byly vyznačovány přímo do uvedeného formuláře (tab. 2) (22).

V porovnání s Rapoportovou studií (20) měli naši pacienti podstatně mírnější průběh mukositivity. Rapoport pozoroval medián maximálního skóre mukositivity 15 u skupiny 202 pacientů, z nichž zhruba 38% bylo transplantováno alogenně a 62% autologně. V naší skupině tvořil medián maximálního skóre 12.5 a pouze 1 pacient dosáhl skóre mukositivity nad 15. Nemohli jsme tedy potvrdit jeho pozorování, kdy pacienti s MUCPEAK ≥ 18 měli 2x vyšší riziko krevní infekce (60% v. 30%) a 6x vyšší riziko úmrtí (24% v. 4%) než pacienti se skóre mukositivity pod 18. V naší skupině jsme úmrtí do 100 dnů po transplantaci nezaznamenali a pouze 3 pozitivní hemokultury neumožňují smysluplné srovnání. Pozorovali jsme ovšem vyšší riziko febrilní neutropenie a delší hospitalizaci u pacientů s těžším průběhem mukositivity. Rozdíly mezi naší a Rapoportovou studií je možno vysvětlit několika způsoby. V naší skupině se nevyskytovali pacienti léčení režimem s celotělovým ozářením, kteří tvořili 30% jeho pacientů a měli signifikantně vyšší skóre mukositivity. Rovněž alogenní transplantace může vést k vyššímu riziku mukositivity, především vzhledem k akutní reakci štetu proti hostiteli (23). Navíc nejtěžší průběh mukositivity z jednotlivých diagnóz měli u Rapoportova pacientů s akutní leukémií a myelodysplastickým syndromem, kteří nebyli v naší studii zastoupeni. Vzhledem k tomu, že Rapoport neuvádí hodnocení perorálního příjmu, nemůžeme provést přímé srovnání. Pozorovali jsme však podstatně nižší potřebu parenterální výživy než Rapoport (průměrně 3.3 dne v. 12.3 dne), což nepřímo svědčí pro to, že naši pacienti skutečně měli průběh mukositivity lehčí a že rozdílná skóre nebyla způsobena subjektivními rozdíly v hodnocení. Otázkou je, do jaké míry jsou tato rozdílná skóre způsobena souběžně podáváním glutaminem, zejména vzhledem k tomu, že studie stále probíhá a ještě nebyla odsloupena. Podávání glutaminu mohlo jistě zkrátit či zmírnit mukositivitu u části pacientů, ale domníváme se, že to nic nemění na validitě prezentovaných výsledků. Naopak, námi publikované hodnocení bylo provedeno mimo jiné proto, abychom si ověřili klinickou validitu námi užívaných markerů mukositivity a měli jistotu, že eventuelní rozdíl v tíži mukositivity mezi skupinou pacientů s glutaminem a bez něho nebude způsoben nekonzistentním měřením. Vzhledem k tomu, že jsme již dříve provedli hodnocení skóre mukositivity na prvních 12 pacientech (24), můžeme konstatovat, že po rozšíření souboru se zjištěné korelace podstatněji nemění, vesměs došlo pouze ke zúžení 95% intervalů spolehlivosti (tab. 7).

Poznatek, že i velmi mírná mukositida zvyšuje riziko nedostatečného perorálního příjmu je velmi významný, protože umožňuje prospektivně odhalit kandidáty aktivní nutriční intervence. V naší studii bylo prováděno sledování perorálního příjmu u všech pacientů, v běžné praxi však sledování mukositivity dle MUCPEAK umožní soustředit se pouze na ohroženou skupinu, tj. pacienty s MUCPEAK nad 10 či nad 12. Hodnocení rizika neadekvátního příjmu dle denního skóre mukositivity pokládáme za smysluplnější než hodnocení pomocí ANC, jednak vzhledem k tomu, že v rutinní praxi nebývá každý den stanovení ANC požadováno, jednak proto, že výpovědní hodnota stoupá se skóre MUCPEAK avšak klesá s poklesem ANC pod 500.

Nutriční intervence u pacientů s mukosítidou nemusí zahrnovat okamžité podání úplné parenterální výživy, ale může spočívat v úpravě diety dle preference pacientů a v přidavné enterální výživě. Tímto postupem se nám podařilo zvýšit standardizovaný orální příjem pacientů léčených autologní transplantací na více než dvojnásobek, čímž bylo dosaženo snížení nároků na totální parenterální výživu průměrně z 5,5 dne na 1,5 dne. Uvedené zvýšení orálního příjmu bylo dosaženo u všech stádií mukosítidy (25). Otázkou dalšího výzkumu je to, zda by bylo možno rovněž antimikrobiální profylaxi omezit pouze na pacienty s těžší mukosítidou, což by vedlo i k nezanedbatelným úsporám, zejména vzhledem k tomu, že cena antimikrobiální profylaxe pro jednoho pacienta v tomto souboru činila průměrně 3250 Kč (95 % CI, 2465-4045 Kč). Prevence a léčba rozvinuté mukosítidy je obtížná. V prevenci mukosítidy způsobené methotrexátem, 5-fluorouracilem nebo mefalanem se osvědčilo ochlazení sliznic ledem po dobu podávání chemoterapie (26), u léčby etoposidem

pak podávání propanthelinu (27). U rozvinuté mukosítidy byl zjištěn příznivý vliv perorálně (23) nebo parenterálně (28) podávaného glutaminu, i když vliv parenterálně podávaného glutaminu v jiné studii nebyl prokázán (29). Rovněž se uvádí příznivé působení parenterálně (30) či orálně (31) podávaných růstových faktorů (G-CSF, GM-CSF), zejména u druhé strategie se však jedná o mimořádně drahou léčbu. Příznivé účinky může mít i podávání keratinocytového růstového faktoru (32) či interleukinu 11 (33). Vzhledem k tomu, že i toto jsou extrémně drahé a dosud experimentální léčebné postupy, je nutné, aby byly nejprve validovány v randomizovaných klinických studiích. Jejich nezbytným předpokladem je právě užití klinicky relevantního skórovacího systému pro sledování mukosítidy. Domníváme se, že námi užitý skóre MUCPEAK plně odpovídá požadavkům, které na takový skórovací systém můžeme uplatňovat a přimlouváme se za jeho další rozšíření v klinickém výzkumu i v běžné praxi.

Literatura

1. Sonis ST: Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncology* 34:39-43, 1998
2. Karthaus M, Rosenthal C, Ganser A: Prophylaxis and treatment of chemo- and radiotherapy-induced oral mucositis - are there new strategies? *Bone Marrow Transplantation*, 24:1095-1108, 1999
3. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RCK: Scoring Oral Mucositis. *Oral Oncology* 34:63-71, 1998
4. Schubert MM, Williams BE, Lloid ME et al: Clinical assessment scale for the rating of oral mucosal changes associated with bone marrow transplantation. *Cancer* 69:2469-2477, 1992
5. Woo SB, Sonis ST, Monopoli MM, Sonis AL: A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer* 72:1612-1617, 1993
6. Matson T, Heimdahl A, Dahllof G et al: Variables predicting oral mucosal lesions in allogeneic bone marrow recipients. *Head Neck* 13:224-229, 1991
7. Maciejewski B, Skladowski K, Pilecki B et al: Randomized clinical trial on accelerated 7 days per week fractionation in radiotherapy for head and neck cancer. Preliminary report on acute toxicity. *Radiotherapy and Oncology*, 40:137-145, 1996
8. Vaughan WP, Kris E, Vose J et al: Phase I/II study incorporating intravenous hydroxyurea into high-dose chemotherapy for patients with primary refractory or relapsed and refractory intermediate grade and high-grade malignant lymphoma. *J Clin Oncol*, 13:1089-1095, 1995
9. Reed EC: Infectious complications of autotransplantation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 7:717-735, 1993
10. Ruescher TJ, Sodeifi A, Scrivani SJ et al: The impact of mucositis on a hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Cancer* 82:2275-81, 1998
11. Sonis ST, Costello KA: A database for mucositis induced by cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer and Oral Oncology* 31B: 258-260, 1995
12. Spijkervet FLK, Van Saene HKF, Panders AK et al: Scoring irradiation mucositis in head and neck cancer patients. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 18:167-171, 1988
13. Byfield JE, Frankel SS, Sharp TR et al: Phase I and pharmacologic study of 72-hour infused 5-fluorouracil and hyperfractionated cyclical radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 11:791-800, 1985
14. Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment, Vol 48. World Health Organization. Offset publication, Geneva, 1979, pp.15-22.
15. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 31:1341-1346, 1995
16. Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB et al: Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. *Cancer* 85:2103-2113, 1999
17. Western Consortium for Cancer Nursing Research: Development of a staging system for chemotherapy-induced stomatitis. *Cancer Nursing* 14:6-12, 1991
18. Armstrong TS: Stomatitis in the bone marrow transplant patient. An overview an proposed oral care protocol. *Cancer Nursing* 17:403-410, 1994
19. Wymenga ANM, van der Graaf WTA, Spijkervet FLK et al: A new in vitro assay for quantitation of chemotherapy-induced mucositis. *British Journal of Cancer* 76:1062-1066, 1997
20. Rapoport AP, Miller Watelet LF et al: Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *Journal of Clinical Oncology*, 17:2446-2553, 1999.
21. Pytlík R, Bendová E, Kozák T, Gregora E: Bakteriologické monitorování hematologických pacientů a jeho význam pro tvorbu klinicky relevantního empirického antimikrobiálního protokolu. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 5:305-310, 1999
22. Paťorková M, Chocenská E: Mukositis a její projevy, sledování perorálního příjmu, spolupráce s dietní sestrou u pacientů léčených vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací krevtvořných buněk. XIV olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, sborník abstrakt str. 96, Olomouc 2000.
23. Anderson PM, Ramsay NKC, Shu XO et al: Effect of low-dose oral glutamine on painful stomatitis during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 22:339-344, 1998
24. Pytlík R, Beneš P, Klepetář J et al: Nebraska oral assesment score (MUCPEAK) a jeho korelace s perorálním příjmem a jinými parametry slizniční toxicity u pacientů léčených vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací krevtvořných buněk (ASCT). XIV olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, sborník abstrakt str. 51, Olomouc 2000
25. Chocenská E, Paťorková M, Pytlík R et al: The role of dietary specialist in nursing of autologous stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplantation*, 27 (suppl. 1), 2001 - odesláno k publikaci
26. Dummonet C, Sonnet A, Bastino Y et al: Prevention of high-dose L-PAM-induced mucositis by cryotherapy. *Bone Marrow Transplant* 14:492-494, 1994
27. Oblon DJ, Paul SR, Oblon MB, Malik S. Propantheline protects the oral mucosa after high-dose ifosfamide, carboplatin, etoposide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 20:961-963, 1997
28. Ziegler TR, Young LS, Benfell K et al: Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. *Annals of Internal Medicine*, 116:821-828, 1992
29. van Zannen HCT, van der Lelie H, Timmer JG et al: Parenteral glutamine dipeptide supplementation does not ameliorate chemotherapy induced toxicity. *Cancer* 74:2879-2884, 1994
30. Nemunaitis J, Rosenfeld CS, Ash R et al: Phase III randomized, double-blind placebo-controlled trial of rhGM-CSF following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 15:949-954, 1995
31. Karthaus M, Rosenthal C, Huebner G et al: Effect of topical oral G-SSF on oral mucositis: a randomised placebo-controlled trial. *Bone Marrow Transplantation*, 22:781-785, 1998
32. Farrel CL, Bready JV, Rex KL et al: Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Research* 58:933-939, 1998
33. Schwerkoske J, Schwartzberg L, Weaver CH et al: A phase I double-masked placebo-controlled study to evaluate tolerability of Neumega (rhIL-11: Oprelvekin) to reduce mucositis in patients with solid tumors off lymphoma receiving high-dose chemotherapy (CT) with autologous peripheral blood stem cell reinfusion (PBSCT). Proc 35th ASCO, abstract 2256, 1999

STANOVENÍ VYBRANÝCH PROGNOSTICKÝCH FAKTORŮ U NEMOCNÝCH S NON-HODGKINSKÝMI LYMFOMY

ASSESSMENT OF SELECTED PROGNOSTIC FACTORS IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

PAPAJÍK T., VONDRÁKOVÁ J., RAIDA L., URBANOVÁ R., FABER E., HUBÁČEK J., HECZKO M., SULOVSKÁ L., KRIEHOVÁ E., JAROŠOVÁ M. A INDRÁK K.

HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

Souhrn: *Východiska:* Non-hodgkinské lymfomy (NHL) představují heterogenní skupinu nádorů, které charakterizuje značná rozdílnost chování uvnitř jednotlivých histologických kategorií. Možnosti léčby těchto chorob jsou dnes velmi široké. Výběr odpovídajícího druhu a intenzity terapie na základě stanoveného individuálního rizika výrazně ovlivňuje nejen prognózu nemocných, ale také kvalitu života v průběhu léčby a po ní. *Typ studie a soubor:* V souboru 123 nemocných s různými histologickými subtypy NHL byl retrospektivně zhodnocen přínos vybraných prognostických parametrů - hladiny laktát-dehydrogenázy (LDH), hodnoty β_2 -mikroglobulinu (β_2M), sérové tymidinkinázy (s-TK) a mezinárodního prognostického indexu (IPI) k stratifikaci léčebného přístupu u těchto chorob. Data byla statisticky analyzována za použití Pearsonova korelačního testu, párového T-testu a chí - kvadrát testu. *Metody a výsledky:* Byl potvrzen statisticky silný vztah hodnot β_2M , s-TK a kategorií IPI k počtu dosažených léčebných odpovědí. V souboru nemocných s IPI 2 hladina $\beta_2M \geq 3,0$ mg/l zřetelně odlišila skupinu rizikových nemocných dosahujících jen omezeného počtu léčebných odpovědí. Index LDH a β_2M nepřinesl novou podstatnou informaci ve srovnání s kombinací výpovědních hodnot IPI a β_2M . Ve skupině níže maligních lymfomů byla potvrzena aplikovatelnost IPI, i když jen menší část nemocných spadala do vyšších rizikových kategorií. *Závěry:* Autoři potvrdili nutnost prognostické stratifikace nemocných s NHL ve vztahu k zamýšlenému typu a intenzitě léčebného postupu. Za základní, snadno dosažitelné a univerzální prognostické ukazatele považují hodnoty IPI, β_2M a s-TK.

Klíčová slova: Non-hodgkinské lymfomy – prognostické faktory – mezinárodní prognostický index – β_2 -mikroglobulin – sérová tymidinkináza.

Summary: *Backgrounds:* Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) represent a heterogeneous group of neoplasms which are characterized by substantial difference of their course even within each histological category. Today we have very broad therapeutic potential. A choice of appropriate kind and intensity of therapy based on individual risk decision markedly affect not only a patient's prognosis but also a quality of life during therapy and after it. *Design and Subjects:* Importance of selected prognostic factors – serum lactate dehydrogenase (LDH), β_2 -microglobuline (β_2M), serum thymidin-kinase (s-TK) and International prognostic index (IPI) to the stratification of therapeutic approach was retrospectively evaluated in the group of 123 patients with different histological subtypes of NHL. Data were statistically analyzed by Pearson's correlation test, matched T-test and chi-square test. *Methods and results:* Significant correlation between β_2M , s-TK values, IPI categories and response to therapy was confirmed. $\beta_2M \geq 3,0$ mg/l in the group of patients with IPI 2 clearly differentiated high-risk individuals with low number of therapeutic responses. LDH and β_2M index did not provide any new substantial information in comparison with IPI and β_2M . An applicability of IPI in a group of low-grade NHL was also confirmed but relatively small number of patients were classified as high-risk according to IPI. *Conclusions:* Authors confirmed requirement of prognostic stratification of NHL patients in connection with type and intensity of therapy. IPI, β_2M and s-TK values can be considered as basic, easy available and universal prognostic factors.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma – prognostic factors – International prognostic index – β_2 -microglobulin – serum thymidin-kinase

Úvod.

Non-hodgkinské lymfomy (NHL) představují velmi nesoudnou skupinu nádorových onemocnění vycházejících z B a T lymfocytů. Vedle variability různých histologických skupin daných původem nádorového klonu existuje také individuální různorodost chování lymfomů uvnitř stejné histopatologické kategorie. Je proto nezbytné určit individuální prognózu vývoje lymfomu a podle ní rozhodnout o způsobu léčby NHL (1,6,13). Současné terapeutické možnosti sahají od pouhé radioterapie a monoterapie cytostatikem, přes moderní kombinovanou chemoterapii a imunoterapii až k vysoce dávkované chemoterapii s podporou autologních kmenových buněk a k alogenním transplantacím. Výběr odpovídajícího druhu a intenzity terapie na základě stanoveného individuálního rizi-

ka výrazně ovlivňuje nejen prognózu nemocných, ale také kvalitu života v průběhu léčby a po ní (6).

Existuje mnoho prognostických ukazatelů s různou výpovědní hodnotou. Zlatým standardem se mezi nimi stal Mezinárodní prognostický index (IPI), původně určený k stratifikaci rizika u nemocných s agresivními lymfomy (5,6,12). Brzy se však ukázalo, že jeho dobrá výpovědní hodnota není omezena jen na tuto skupinu lymfomů, ale že se může stát jakýmsi základním prognostickým ukazatelem platným pro všechny druhy lymfomů (3,9,11). Na druhé straně ovšem platí, že tento index lze v jeho prognostických předpovědích doplnit některými dalšími neinvazivními a snadno dostupnými parametry - například hladinou β_2 -mikroglobulinu (β_2M), sérové tymidinkinázy (s-TK) či indexem laktát-dehydrogenázy (LDH) a β_2M (4,7,8,10,14).

V této práci jsme si vytkli za cíl aplikovat IPI na soubor nemocných s lymfoidními malignitami všech histologických subtypů dispenzarizovanými na naší klinice a doplnit jej o vyšetření $\beta 2M$ a s-TK se zhodnocením jejich výpovědní hodnoty ve vztahu k dosažení léčebné odpovědi.

Soubor nemocných a metody

Analyzovaný soubor tvořilo 123 nemocných s NHL dispenzarizovaných na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc v letech 1995-1998. Medián věku souboru byl 55 let (18 až 87 roků), poměr mužů k ženám byl 1:1,3. 33 nemocných mělo diagnózu mantle cell lymfomu (MCL), 32 nemocných pak diagnózu agresivního NHL (difúzní velkobuněčný - DLCL a lymfoblastický - LB - lymfom), 31 pacientů trpělo lymfomem z folikulárních center (FL), ostatní indolentní lymfomy byly zastoupeny 16 případy (LGL), nejmenší skupina T-buněčných lymfomů (T-NHL) čítala 11 jedinců. Ve stádiu I dle klasifikace přijaté v Ann Arbor se při diagnóze nacházelo 13 nemocných (10 %), ve stádiu II 20 pacientů (16 %), ve stádiu III 18 jedinců (15 %) a ve stádiu IV 72 pacientů (59 %).

U nemocných byly hodnoceny následující parametry - hladina laktát-dehydrogenázy ($\mu\text{kat/l}$), hodnota β_2 -mikroglobulinu (mg/l), hodnota sérové tymidinkinázy (U/l), hodnota mezinárodního prognostického indexu (IPI) a odpověď na chemoterapii dle zvyklých kritérií (kompletní remise - CR, partiální remise - PR, bez odpovědi na terapii či progresse choroby na terapii - NR). Strukturu IPI a jeho výpočet zde neuvádíme, neboť je dostatečně známa.

Data byla statisticky analyzována za použití Pearsonova korelačního testu, párového T-testu a chí - kvadrát testu.

Výsledky

36 nemocných mělo hodnotu IPI 0 a 1, 32 nemocní pak hodnotu 2, 21 nemocný hodnotu 3 a 34 pacienti hodnotu 4 a 5.

U 112 nemocných souboru byl před léčbou vyšetřena hladina $\beta 2M$, její medián byl 3,3 mg/l (1,2 - 33,5). U 99 pacientů pak byla vyšetřena hladina s-TK s mediánem 16,8 U/l (2,6 - 100,0). Podle literárních údajů a našich vlastních zkušeností byly proto jako hraniční hodnoty dělicí dvě prognosticky odlišné skupiny nemocných zvoleny hladiny 3,0 mg/l pro $\beta 2M$ a 13,5 U/l pro s-TK. Tab. 1 názorně ukazuje výraznou tendenci k rozdílné odpovědi na léčbu ve skupinách nemocných s $\beta 2M$ a 3,0 mg/l (53 % versus 88 %) a s-TK a <13,5 U/l (59 % versus 84 %). Tyto rozdíly byly statisticky signifikantní ($p=0,001$, resp. $p=0,02$).

Rozdělení souboru podle hodnoty IPI, počet dosažených léčebných odpovědí, počet nemocných s hodnotou $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a hodnotou s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$ v jednotlivých skupinách IPI přehledně dokumentuje Tab.2. Z ní je patrná sestupná tendence počtu dosažených léčebných odpovědí se zvyšující se hodnotou IPI a vzestupná tendence počtu nemocných s hodnotami $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$ spolu se zvyšující se hodnotou IPI.

Pokud byla dělána statistická analýza významnosti rozdílů počtu dosažených odpovědí mezi soubory s různým IPI, pak bylo nutné konstatovat, že chí-kvadrát test potvrdil statisticky velmi silnou signifikanci následujících rozdílů: mezi skupinou IPI 0, 1 a 3 ($p=0,0001$), mezi soubory IPI 0, 1 a 4, 5 ($p=0,000001$) a mezi soubory IPI 2 a 4, 5 ($p=0,003$). Hraniční byl rozdíl mezi skupinami IPI 0, 1 a 2 ($p=0,06=NS$) a mezi soubory IPI 2 a 3 ($p=0,06=NS$), naopak nevýznamný byl rozdíl mezi skupinou nemocných s IPI 3 a IPI 4, 5 ($p=0,7=NS$). Velmi podobný statistický rozdíl byl zjištěn mezi výskytem jedinců s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$.

Na základě těchto závěrů jsme podrobněji analyzovali soubor nemocných s IPI 2, kde 17 ze 30 jedinců mělo vyšší hodnotu $\beta 2M$ a 15 z 27 vyšetřených mělo vyšší hladinu s-TK. Vztahy mezi hodnotami $\beta 2M$ a s-TK a mírou odpovědi nemocných na léčbu uvádíme v tab. 3. Z ní je patrné, že nemocní s hodnotou $\beta 2M$ nižší jak 3,0 mg/l mají signifikantně lepší odpověď na tera-

Tab. 1. Poměrné srovnání počtu léčebných odpovědí u nemocných s $\beta 2M \geq a < 3,0 \text{ mg/l}$ a s-TK $\geq a < 13,5 \text{ U/l}$ v souboru nemocných bez rozdílu hodnot IPI

	Nemocní s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ (%) n=55	Nemocní s $\beta 2M < 3,0 \text{ mg/l}$ (%) n=49	Nemocní s s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$ (%) n=53	Nemocní s s-TK $< 13,5 \text{ U/l}$ (%) n=38
CR	22	70	25	68
PR	31	18	34	16
NR	47	12	41	16
p	0,001		0,02	

Tab. 2. Rozdělení souboru dle hodnot IPI, srovnání počtu léčebných odpovědí, počtu nemocných s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$.

Hodnota IPI	Počet nemocných (%) n=123	CR (%)	PR (%)	NR (%)	Nemocní s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ (%) n=60	Nemocní s s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$ (%) n=57
0 a 1	29	76	12	12	8	11
2	26	48	26	26	57	56
3	17	16	42	42	84	88
4 a 5	28	10	38	52	89	89

Tab. 3. Poměrné srovnání počtu léčebných odpovědí u nemocných s $\beta 2M \geq a < 3,0 \text{ mg/l}$ a s-TK $\geq a < 13,5 \text{ U/l}$ ve skupině nemocných s IPI 2.

	Nemocní s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ (%) n=17	Nemocní s $\beta 2M < 3,0 \text{ mg/l}$ (%) n=10	Nemocní s s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$ (%) n=14	Nemocní s s-TK $< 13,5 \text{ U/l}$ (%) n=10
CR	29	69	36	60
PR	29	31	28	20
NR	42	0	36	20
p	0,0004		0,06 = NS	

Tab. 4. Poměrné srovnání počtu léčebných odpovědí u nemocných s indexem LDH a $\beta 2M$.

	Nemocní s $\beta 2M < 3,0 \text{ mg/l}$ a LDH $< 7,8 \text{ ukat/l}$ (%) n=31	Nemocní s $\beta 2M < 3,0 \text{ mg/l}$ a LDH $\geq 7,8 \text{ ukat/l}$ nebo $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a LDH $< 7,8 \text{ ukat/l}$ (%) n=30	Nemocní s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ a LDH $\geq 7,8 \text{ ukat/l}$ (%) n=42
CR	79	27	13
PR	12	33	35
NR	9	40	52

Tab. 5. Rozdělení souboru nemocných s níže maligními lymfomy podle hodnot IPI a srovnání počtu léčebných odpovědí.

Hodnota IPI	Počet nemocných (%) n=47	CR (%)	PR (%)	NR (%)
0 a 1	40	72	17	11
2	28	58	25	17
3	17	14	43	43
4 a 5	15	0	50	50

pii ($p=0,0004$) než nemocní s hodnotou $\geq 3,0 \text{ mg/l}$ (počet léčebných odpovědí 100 % versus 58 %, počet CR 69 % versus 29 %). Léčebné odpovědi v souborech s rozdílnou hodnotou s-TK měly také tendenci se chovat podobně jako při rozdělení s $\beta 2M$, nicméně statisticky tyto difference přesvědčivé nebyly ($p=0,06=NS$).

Z celého souboru jsme navíc vyčlenili nemocné, kteří měli před započítáním léčby, respektive při stanovení diagnózy NHL vyšetřenou hladinu LDH (normální hodnota do 7,8 $\mu\text{kat/l}$) a $\beta 2M$ a zároveň u nich mohla být zhodnocena léčeb-

ná odpověď. Skupina splňující uvedené požadavky čítala 103 nemocné, kteří byli rozděleni na 3 skupiny: 1. skupina - normální hodnota LDH a $\beta 2M$ pod 3,0 mg/l, 2. skupina s 1 faktorem vyšším než ve skupině jedna (lhostejno jakým) a 3. skupina, kde byla hladina LDH vyšší nad normu a $\beta 2M \geq 3,0$ mg/l u všech jedinců. Poměrný počet léčebných odpovědí ve 3 různých skupinách tohoto indexu LDH a $\beta 2M$ dokumentuje Tab.4. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi 1. a 2. skupinou ($p=0,03$) a mezi 1. a 3. skupinou ($p=0,01$). Naopak bez statisticky významného rozdílu byly sledované veličiny v porovnávaných skupinách 2. a 3. ($p=NS$).

Na závěr jsme provedli orientační analýzu 47 nemocných s nízké maligními lymfomy (31 nemocných s folikulárním lymfomem, 8 pacientů s lymfomem z malých lymfocytů, 5 nemocných s lymfomem marginální zóny a 3 jedinci s lymfoplazmocytárním lymfomem). Medián IPI byl 2 (0-5), 18 nemocných (40 %) mělo IPI 0 a 1, 13 nemocných (28 %) 2, 8 pacientů (17 %) pak 3 a hodnotu 4 nebo 5 mělo 7 nemocných (15 %). Z uvedené tabulky (Tab.5) je patrná snižující se odezva na léčbu s rostoucí hodnotou IPI. Pokud jsme hodnotili rozdíly mezi skupinami s IPI 2 a 3, je zřejmé, že skupina s IPI 3 má jednoznačně špatnou prognózu, kdežto ve skupině s IPI 2 je nutné zvážit další prognostické faktory. Pokud jsme navíc porovnali mediány hodnot $\beta 2M$ a s-TK, pak tyto byly pro skupinu s IPI 3 jednoznačně nepříznivější ($\beta 2M$ 6,6 versus 2,8 mg/l, s-TK 100,0 versus 10,7 U/l) stejně jako počet nemocných s dodatečně dohledanou hladinou hemoglobinu nižší jak 120 g/l (75 versus 15 %).

Diskuze

Moderní léčebné postupy výrazně změnily prognózu nemocných s NHL. Nezanedbatelnou část jich dovedeme vyléčit, další velké skupině dovedeme výrazně prodloužit život (OS), dobu bez příznaků nemoci (DFS) a výrazně zlepšit kvalitu života (1,6). Stanovení individuální prognózy se stalo klíčovým momentem v rozhodování o výběru adekvátního léčebného přístupu. Nemocní s nízkým rizikem nedosažení remise choroby, s pravděpodobností dlouhodobého přežití a eventuálně vyléčení jejich NHL dostatečně profitují z moderně vedené chemo- či radioterapie. Velmi intenzivní postupy jako je například vysoce dávkovaná chemoterapie s podporou infúze autologních kmenových buněk by u nich znamenaly neadekvátní riziko těžkých toxických reakcí. Naopak nemocní s vysokým rizikem choroby dosahují pomocí moderní konvenční chemoterapie jen malého počtu kompletních odpovědí a jejich medián DFS a OS je krátký. U nich je potřeba aplikovat dnešní nejintenzivnější metody léčby včetně transplantací kmenových buněk, léčby monoklonálními protilátkami, imunoterapie a další nové, třeba i experimentální postupy (12,13).

K přijetí rozhodnutí o riziku pacienta nám slouží celá plejáda tak zvaných prognostických faktorů. Ty různým způsobem a s různou výpovědní hodnotou odrážejí různé rysy chování lymfomu, respektive ukazují jak se choroba bude pravděpodobně dále vyvíjet. Prvním uceleným prognostickým systémem pro agresivní NHL byl Prognostický index navržený francouzskou GELA skupinou pod vedením B.Coiffiera v roce 1991. Ten hodnotil 4 parametry - masu lymfomu větší jak 10 cm, počet postižených extranodálních orgánů ve více jak 1 případě, stádium III a IV a zvýšenou hladinu LDH - podle speciální tabulky. Vznikly tak 3 úrovně indexu, každá s odlišným 3-letým přežitím (5). Na tento projekt navázala skupina vedená M.Shippovou, která zkompletovala data poskytnutá 16 institucemi a kooperativními skupinami z Evropy, USA a Kanady. Na základě rozboru 3273 nemocných s agresivními NHL byla vyčleněna skupina 5 nezávislých prognostických ukazatelů (věk, LDH, performance status, stádium a počet postižených extranodálních orgánů), která byla aplikována na skupinu 2031 pacientů s dostupnými kompletními daty. Byl vytvořen Mezi-

národní prognostický index a věku přizpůsobený IPI (pro nemocné mladší 60 let), jehož jednotlivé hladiny definovaly skupiny nemocných s rozdílnou pravděpodobností dosažení kompletní remise, intervalu bez návratu choroby a celkového přežití (12).

Práce z poslední doby prokázaly možnou aplikovatelnost IPI na všechny skupiny lymfomů, avšak také nutnost doplnění prognostické stratifikace o další ukazatele. V tomto směru byly intenzivně studovány $\beta 2M$, s-TK, proliferativní charakteristiky lymfomových elementů, hladiny některých interleukinů a povrchových molekul buněk NHL (2,3,7,8,9).

V naší studii jsme ověřovali aplikovatelnost $\beta 2M$, s-TK a IPI (hodnoty v době stanovení diagnózy) na náš soubor pacientů s NHL různých histologických skupin se zaměřením na počet dosažených léčebných odpovědí.

55 (53 %) nemocných vykazovalo $\beta 2M \geq 3,0$ mg/l, tito nemocní měli celkově statisticky menší počet dosažených CR a PR choroby a větší počet NR, stejný závěr mohl být přijat pro skupinu 53 (58 %) nemocných s s-TK $\geq 13,5$ U/l.

Prokázali jsme očekávané výrazné rozdíly léčebné odpovědi mezi skupinami s IPI 0, 1 a 3, respektive 0, 1 a 4, 5. Naopak nevýrazný byl rozdíl mezi skupinou IPI 3 a IPI 4, 5. Statisticky hraniční, a proto z hlediska další analýzy zajímavý byl rozdíl mezi skupinami IPI 0, 1 a 2, a mezi IPI 2 a 3. Proto jsme ve skupině s IPI 2 a 3 analyzovali hodnoty $\beta 2M$ a s-TK. V souboru s IPI 2 byl $\beta 2M \geq 3,0$ mg/l u 57 % nemocných a s-TK $\geq 13,5$ U/l u 58 % pacientů. Tito nemocní měli vyšší pravděpodobnost dosažení jen PR nebo NR než nemocní s hodnotami pod tyto meze. Zvláště rozdíly mezi hodnotami $\beta 2M$ zde dosahovaly statisticky velmi výrazné hladiny. Proto lze $\beta 2M$ a v menší míře i s-TK považovat za velmi významné (a možná nezávislé) faktory předpovědi odpovědi na léčbu ve skupině IPI 2.

Ve skupině s IPI 3 mělo vyšší hladinu $\beta 2M$ 84 % nemocných a vyšší s-TK 82 % jedinců. To spolu s analýzou odpovědi na léčbu ukazuje na celkovou prognostickou nepříznivost pacientů s IPI 3.

Vyzkoušeli jsme také aplikaci indexu LDH a $\beta 2M$ na skupinu 103 nemocných s vyšetřenými oběma ukazateli. Pokud měl pacient hodnotu obou dvou ukazatelů nízkou, pak ve většině případů dosáhl kompletní léčebné odpovědi, při zvýšení jednoho či obou faktorů se poměr obrátil ve prospěch PR či NR. Statistický rozdíl byl dokumentován pro srovnání první skupiny s ostatními dvěma podsoubory, rozdíl mezi zbylými dvěma podsoubory navzájem nebyl prokázán, což do určité míry limituje význam výpovědní hodnoty indexu LDH a $\beta 2M$.

Pokud můžeme hodnotit analýzu menšího souboru nemocných s nízké maligními lymfomy, pak rozbor nepřinesl žádné podstatnější překvapivé informace, které by se neshodovaly se závěry analýzy celého souboru. Snad jen, že v soulase s literárními údaji (3,9) se v nejvyšším riziku dle IPI nalézá obecně menší počet nemocných než v souborech s agresivními lymfomy, a naopak větší počet nemocných má IPI 0 nebo 1 (viz tab. 5). Ovšem také pro tuto skupinu lymfomů můžeme potvrdit prognostickou nepříznivost skupiny nemocných s IPI 3 a nutnost doplnění prognostické stratifikace nemocných s nižšími hodnotami IPI pomocí dalších ukazatelů.

Z naší práce vyplývá následující:

1. Mezinárodní prognostický index je standardním prognostickým modelem pro všechny histopatologické skupiny NHL s dobrou výpovědní hodnotou předpovědi dosažení kompletní léčebné odpovědi.
2. Skupina nemocných s IPI 0 a 1 odpovídá velmi dobře na podanou terapii vysokým procentem CR, kdežto skupina nemocných s IPI 4 a 5 dosahuje CR jen vyjimečně a konvenční léčba u ní vede k léčebnému selhání.
3. Podle našich zkušeností pacienti s NHL a IPI 3 mají velmi vysokou pravděpodobnost dosažení jen PR nebo NR, o čemž svědčí také vysoké hladiny $\beta 2M$ a s-TK nalezené u více než 80 % jedinců. Tito nemocní by měli být léčeni protokolárně chemoterapií pro vysoce rizikové nemocné.

4. Velkou pozornost je třeba věnovat nemocným s IPI 2. V této skupině nemocných existují 2 podsoubory, které lze rozeznat na základě analýzy dalších prognostických faktorů. Nemocní s $\beta 2M \geq 3,0 \text{ mg/l}$ (a v menší míře i s-TK $\geq 13,5 \text{ U/l}$) patří k rizi-

kové podskupině s častým selháním léčby a nízkou pravděpodobností dosažení CR.

Práce byla podpořena grantem IGA č. 312/98/0425.

Literatura

1. Aisenberg A.C.: Coherent view on non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 13, 1995, s.2656-2675.
2. Bastion Y., Berger F., Bryon P. A. et al.: Follicular lymphomas: Assessment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann. Oncol.* 9, 1991, s.123-129.
3. Bastion Y., Coiffier B.: Is the international prognostic index for aggressive lymphoma patients useful for follicular lymphoma patients? *J.Clin.Oncol.* 12, 1994, s.1340-1342.
4. Blay J.Y., Burdin N., Rousset F. et al.: Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 82, 1993, s.2169-2174.
5. Coiffier B., Gisselbrecht C., Vose J.M., et al: Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas: description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. *J.Clin.Oncol.* 9, 1991, s.211-219.
6. Coiffier B., Salles G., Bastion Y.: Prognostic factors in non-Hodgkin's lymphomas. In Magrath I. (ed.): *The Non-Hodgkin's Lymphomas*, 2nd edition, London: Arnold, 1997, s.739-768.
7. Hallek M., Wanders L., Ostwald M., et al: Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma* 22, 1996, s.439-447.
8. Hallek M., Wanders L., Strohmeyer S., et al: Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann.Hematol.* 65, 1992, s.1-5.
9. Hermans J., Krol A.D.G., vanGroningen K., et al: International prognostic index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades. *Blood* 86, 1995, s.1460-1463.
10. Litam P., Swan F., Cabanillas F. et al.: Prognostic value of serum B2-microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann.Intern.Med.* 114, 1991, s.855-860.
11. Lopez-Guillermo A., Montserrat E., Bosch F., et al.: Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 12, 1994, s.1343-1348.
12. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R., et al: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 329, 1993, 987-994.
13. Shipp M.A.: Prognostic Factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood* 83, 1994, s.1165-1173.
14. Swan F., Velasquez W.S., Tucker S. et al.: A new serologic staging system for large cell lymphomas based on initial $\beta 2$ -microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J.Clin.Oncol.* 7, 1989, s.1518-1527.

FIFTH WORLD CONFERENCE ON MELANOMA 28.2.-3.3.2001, BENÁTKY

XXXI Review Meeting W.H.O. Melanoma Group

V. FAIT, V. VAGUNDA

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Místem konání světové konference o melanomu se v letošním roce staly italské Benátky. Samotný program pokrýval prakticky celou problematiku melanomu, jak z pohledu klinického, tak z pohledu základního výzkumu. Konference byla organizována tak, že během dopolední probíhal jednotný program, vyžádané přednášky předních odborníků, odpolední program pak byl rozdělen na jednotlivé sekce, takže bylo možno si zvolit problematiku nejbližší vlastnímu zaměření.

Z pohledu klinika byly v popředí diagnostické techniky, rozsáhlá část prostoru byla věnována problematice sentinelových biopsií, zaslouženou pozornost měla epidemiologie a metody primární a sekundární prevence melanomu. V upravené podobě byl představen návrh nové TNM klasifikace melanomu. Probrána byla pochopitelně i terapie, především v problematických oblastech, zejména imunoterapie.

V oblasti klinické diagnostiky se v současnosti objevují poměrně dobře propracované pokusy, jak zpřesnit klinickou a dermatoskopickou diagnostiku spojením s výpočetní technikou. Počítač tedy může částečně zastoupit zkušenost vyšetřujícího a za pomoci zhodnocení dermatoskopických znaků při srovnání s případy, které jsou uloženy v paměti a určit pravděpodobnou diagnózu. Současně může sloužit i ke skladování záznamů s možností přesného srovnávání vývoje jednotlivých morf. Ač se jistě jedná o do budoucna velmi slibnou techniku, prozatím ji nelze jednomyslně doporučovat. Při primární diagnostice nemůže mít lepší výsledky než zkušený klinik, zajímavé je pro sledování. Bylo konstatováno, že dokud tyto přístroje nebudou mít zásadní výhodu proti lidskému oku (tedy například posuzování i v jiných spektrálních oblastech) nebudou schopny nabídnout jednoznačně lepší výsledky než klinické vyšetření. Nicméně snaha o zakomponování dalších způsobů pozorování již byla zahájena, takže pravděpodobně v dohledné době budou existovat přístroje nových generací. Koncept sentinelové uzliny zásadním způsobem rozšířil uvažování onkologů a nastolil mnohé zásadní otázky ohledně prognostického významu mikrometastáz a terapeutických implikací. U melanomu je technika sentinelové biopsie používána nejdéle. Co se metodiky samotné týče, jako nejlepší je doporučována kombinace radionavigované chirurgie s vitálním barvivem, pochopitelně včetně lymfoscintigrafie před zákrokem. Bylo konstatováno, že metoda je poměrně dobře reprodukovatelná, všechna pracoviště, kde je metoda používána, hlásí téměř shodné výsledky. Tomu odpovídalo i sdělení o výsledcích na našem pracovišti. Stav sentinelové uzliny téměř jednoznačně určuje stav regionálních uzlin, tedy negativní uzlina znamená, že disekce regionální lymfatické oblasti pacientovi nepřinese benefit. Stav sentinelové uzliny je jednoznačně nejsilnějším prognostickým faktorem, nicméně tradiční prognostické faktory, tedy především tloušťka melanomu a ulcerace jsou nadále velmi silnými (a nezávislými!) prognostickými faktory. Tedy u tlustých resp. ulcerovaných melanomů je i při negativním nálezu v sentinelové uzlině prognóza velmi špatná. V současné době bude zahájena studie, která by měla blíže zkoumat osud pacientů s pozitivním nálezem v sentinelové uzlině v závislosti na velikosti a typu postižení sentinelové uzliny.

Melanom je nádorem, u něhož je vyvíjen tlak na primární a sekundární prevenci. Výhodou u tohoto nádoru je to, že hlavní epidemiologický faktor je dobře definován a je preventabilní, další výhodou je to, že sekundární prevence může být poměrně jednoduchá – nádor je ve většině případů přístupný zraku. V této oblasti mají vedoucí postavení pochopitelně oblasti s nejvyšším výskytem melanomu, tedy Austrálie, Nový Zéland a jihozápad USA. Primární prevence probíhá především formou osvěty, jejíž výsledky byly pěkně demonstrovány snímky Australanů, sledujících tenisové utkání na začátku 20. století (všichni oblečení a v klobouku), v polovině 20. století (všichni v plavkách) a na začátku 21. století (opět všichni oblečení, v klobouku a s brýlemi). Přes tyto viditelné úspěchy se však dosud nepodařilo zvrátit rostoucí trend tohoto onemocnění, jistou dobu vládlo přesvědčení, že u mladých Australanů se trend snižuje, bylo ale zjištěno, že se jednalo o zkreslení, způsobené přílivem nebělošské populace. Tato fakta spolu s vysokou finanční náročností celoplošných preventivních akcí a v současnosti stále častěji se objevující pochybnosti o skutečném přínosu screeningových programů vedlo k zahájení rozsáhlé studie v Queenslandu, kde byla vytvářena města s podobnými demografickými, ale i geografickými, znaky a tato byla randomizována. V jedné části probíhají velmi intenzivní osvětové akce spolu s celoplošným screeningem, další část slouží jako kontrola. Po několika letech budou zhodnoceny rozdíly ve výskytu, po dalších letech pak budou hodnoceny i rozdíly v mortalitě.

Byl předložen návrh upravené TNM klasifikace melanomu. Návrh byl vytvořen na základě kritiky dosavadního modelu, s použitím výsledků rozsáhlého souboru pacientů, čímž byl vytvořen model, který je sice o něco složitější, v němž však stádium velmi přesně určuje prognózu. V kategorii T je jednoznačný důraz kladen na tloušťku melanomu, tedy na hodnotu, zatíženou nejmenší subjektivní chybou. Kategorie T1 má hraniční hodnotu 1mm. Z hodnocení byla vypuštěna úroveň invaze dle Clarka (kromě podkategorie u T1), přidáno bylo rozdělení dle přítomnosti nebo nepřítomnosti ulcerace. V kategorii N1 je nejdůležitějším prognostickým faktorem počet metastatických uzlin, tedy bylo vypuštěno hodnocení dle velikosti metastázy a změněno na hodnocení dle počtu. Přidáno bylo rozdělení na metastázy zjištěné sentinelovou biopsií (mikrometastázy) a metastázy jinak detekovatelné (klinicky, sonograficky), do kategorie N byly přidány metastázy intrasitní a satelity, které jsou takto chápány jako metastázy v lymfatické oblasti. Kategorie M1 byla rozdělena do tří skupin podle prognózy, dále byla jako nepříznivý prognostický faktor zohledněna hladina LDH.

Za nejlepší prognostický model pro melanom se považuje model který publikoval W.Clark Jr., rozšířený o prognosticky negativní význam ulcerace.

V oblasti terapie je relativní konsensus ohledně terapie primárního melanomu, která je vždy chirurgická, nejsou ani velké pochybnosti o rozsahu excise. Elektivní disekce v současnosti nejsou doporučovány. Sentinelová biopsie by měla být součástí stagingu minimálně u všech pacientů, u nichž je možný vstup do klinických studií. Při pozitivním nálezu v sentinelové uzlině je indikována disekce příslušné regionální lymfatické oblasti, jsou však pochybnosti o tom, zda je tento postup vždy nezbytný. Incidence dalších uzlinových metastáz při pozitivně sentinelové uzlině je cca 20%. U pacientů s Breslow nad 4,0 mm nebo s uzlinovými metastázami je doporučováno adjuvantní podání vysokodávkovaného interferonu alfa, není však standardem. WHO trial No. 16 ukázal, že inter-

Kategorie:

Kategorie T	Tloušťka	Ulcerace
T1	do 1,0 mm	a) bez ulcerace a invaze I a II b) s ulcerací nebo invaze III a IV
T2	1,01-2,0mm	a) bez ulcerace b) s ulcerací
T3	2,01-4,0mm	a) bez ulcerace b) s ulcerací
T4	nad 4,0 mm	a) bez ulcerace b) s ulcerací
Kategorie N	Počet metastatických uzlin	Velikost uzlinových metastáz
N1	1 uzlina	a) mikrometastáza b) makrometastáza
N2	2-3 uzliny	a) mikrometastázy b) makrometastázy
N3	4 nebo více uzlinových metastáz nebo paket nebo intransitní nebo satelitní metastázy s uzlinovými metastázami	c) intransitní metastázy nebo satelity bez uzlinových metastáz
M klasifikace	Místo	Sérová LDH
M1a M1b M1c	Vzdálené kožní, podkožní nebo uzlinové metastázy Plicní metastázy Ostatní viscerální metastázy Jakékoliv vzdálené metastázy	Normální Normální Normální Zvýšená

Stádia:

0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
IIIC	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
	Jakékoliv T	N3	M0
IV	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1a-c

feron alfa 2a, v dávce 3 miliony jednotek 3x týdně po dobu 3 roků, nezlepšil u pacientů s uzlinovými metastázami disease-free ani celkové přežití. Při výskytu relapsů, ať již lokoregionálních nebo vzdálených je vždy na prvním místě chirurgická terapie, která i při vzdálených orgánových metastázách při kompletním odstranění významně zlepšuje přežití pacientů. Za relativně standardní proceduru je považována izolovaná perfuze končetin melphalanem při vícečetných lokoregionálních relapsech.

V řadě přednášek byla prezentována oblast biologie, patologie a prognostických faktorů melanomu.

Poruchy mezibuněčných interakcí na úrovni melanocyty-keratinocyty zahrnují patologický status E-cadherinu, desmogleinu, conexinu. Mutace beta catenininu má stimulační efekt pro

růst melanomu, kde se dále uplatňuje N-cadherin, c-met, IL-8. Nejdůležitějším faktorem autokrinní stimulace je basický FGF. V parakrinní stimulaci (melanom-stroma) dominuje VEGF. IGF stimuluje růst cestou MAP kinasy. MCP-1 produkovaný melanomovými bb. stimuluje monocyty k produkci VEGF a IL-8, až při vyšší hladině MCP-1 se začíná uplatňovat protinádorová imunitní reakce. Adhesní molekuly - integriny, fibronectin, tenascin, gangliosidy, ICAM-1, MelCAM/MUC18, CD44, CSPG se účastní v invazi melanomu, prognostický význam je prokazován zejména u beta3 integrinu.

Mutace (onko)genů ras, myb, myc, fos, jun - nalezeny především v liniích, v některých pracích se prokazuje vztah k prognóze melanomu. Proliferace (Ki67, cykliny a jejich regulátory) je významně vyšší ve vertikální růstové fázi melanomu, nezávislý prognostický význam v některých studiích. Ztráta exprese melastatinu znamená horší prognózu. Naopak blokáce signálování cestou EGFR a LDP-341 proteasomový inhibitor zvyšuje apoptózu.

U sentinelových uzlin se multivariální analýzou prokazuje prognostický význam nejen počtu pozitivních uzlin, ale i morfometricky stanovené plochy tumoru. Při nálezů dalších pozitivních uzlin je dále prognosticky významný průměr největšího metastatického fokusu. Molekulární uzlinový staging PCR technikou (tyrozinasa) ukazuje prognostický význam - horší prognosa při pozitivě v podskupině histopatologicky negativních uzlin. Rozšiřuje se c-DNA microarray technika pro genomicky orientovanou diagnostiku s napojením na analytické computerové technologie pro dekódování kombinací dat. Více sympozii bylo věnováno tradičně obtížné histopatologické diferenciální diagnostice lézí jako Spitz névus (Spitzoidní melanom), atypický halo névus, kongenitální névus s proliferativními noduly, desmoplastický, névoidní, subunquální a myxoidní melanom. Při nemožnosti jednoznačného posouzení malignity se doporučuje odebrat a vyšetřit sentinelovou uzlinu. Pracovní skupina patologů při WHO Melanoma Programme, vedoucí prof. M. Mihm, předložila brožurku Histopathologic diagnosis of melanoma. Mezi její další aktivity patří studie prognostické významnosti TIL a studie přesnosti diagnostiky radiální růstové fáze melanomu.

onkologické společnosti

ZÁPIS Z 15. ZASEDÁNÍ VÝBORU ČOS KONANÉHO DNE 10. DUBNA 2001

Přítomni: prof. Klener Pavel
doc. Petruželka Luboš
MUDr. Drbal Josef
MUDr. Jelínková Alena
as. Příbylová Olga
MUDr. Šmelhaus Vratislav
prof. Vorlíček Jiří
doc. Žaloudík Jan
MUDr. Fischer Jan

Omluven: prof. Koutecký Josef

1. Kontrola zápisu

Zápis schválen bez připomínek, úkoly splněny.

2. Výbor se zabýval výsledkem mimořádné schůze pediatrické sekce ČSOS, konané dne 4. 4. 2001. Z pověření výboru se této schůze zúčastnil prim Fischer.

Členská schůze se jednomyslně přihlásila k prohlášení výboru ČOS ze dne 13. 2. 2001. Odvolala dosavadní výbor a zvolila do čela pediatrické sekce doc Eckschlagera a MUDr. Dembickou sekretářkou sekce. MUDr. Dembická funkci odmítla, sekretář bude zvolen dodatečně.

3. Výbor obdržel rovněž seznam členů chirurgické sekce. I zde někteří členové nepodalí dosud přihlášku do ČOS. Na existenci této sekce upozornil prof. Klener předsedu Chirurgické společnosti ČLS doc. Havlíčka dopisem.

4. Výbor schválil přijetí nových členů. Byli přijati:

Prof. MUDr. Duda Miroslav – II. chirurg, klinika Olomouc
MUDr. Stehlík Daniel – II. chirurg, klinika Olomouc
Prim. MUDr. Gryga Adolf – II. chirurg, klinika Olomouc
MUDr. Švach Ivan – II. chirurg, klinika Olomouc
MUDr. Novák Jaroslav – chirurg, odd. nem. Kroměříž
MUDr. Řezáč Vladimír – chirurg, odd. nem. Kroměříž
MUDr. Soukup František – chirurg, odd. nem. Kroměříž
Prof. MUDr. Král Vladimír – I. chir. klinika Olomouc
MUDr. Vrba Radek – I. chir. klinika Olomouc
MUDr. Aujeský René – chir. klin. Olomouc
Doc. MUDr. Neoral Čestmír – I. chir. klinika Olomouc
PhD. MUDr. Klein Jiří – I. chir. klinika Olomouc
MUDr. Hruban Bohumil – chirurg, odd. nem. Prostějov
MUDr. Horna Jan – chir. odd. nem. Prostějov
MUDr. Pistulka Jiří – chir. odd. nem. Prostějov
MUDr. Vildomec Karel – chir. odd. nem. Prostějov
MUDr. Hunák Ivan – chirurgie, Bafova nem. Zlín
MUDr. Tkadlecová Dagmar – chirurgie, Bafova nem. Zlín
MUDr. Kubáček Jiří – Schering – Plough, odd. HOBU
MUDr. Vít Vítězslav – urologická klinika Brno
MUDr. Bartoš Jiří – onkocentrum, nem. Liberec
MUDr. Holíková Marta – onkocentrum, nem. Liberec
MUDr. Burkoň Petr – odd. radiační onkol., nem. u sv. Anny v Brně

Ukončení členství: MUDr. Marek Broul.

Všem nově přijatým členům bude zaslána informace o přijetí (zařídí pí. Schweínerová).

5. ČLS zaslala výboru zprávu o hospodaření v r. 2000. Předáno pokladníkovi prim. Fischerovi, který na příštím výboru podá stručnou informaci.

6. Výbor se zabýval aktualizací koncepce oboru klinická onkologie. Všichni členové byli vyzváni, aby do příští schůze zpracovali připomínky. Návrh nové koncepce oboru bude hlavním bodem jednání příští schůze.

7. Vypracováním katalogu nehraných výkonů pro obor klinická onkologie a aktualizací seznamu výkonů proplácených v oboru klinická onkologie byla pověřena as. Příbylová, která připraví dopis pro pojišťovny s příslušným návrhem.

8. Výbor se podrobně zabýval pracovní verzí Náplně předatestační přípravy v oboru klinická onkologie (LOGBOOK). Doporučil četné doplňky, které zapracuje doc. Petruželka. Opravená verze bude předána IPVZ do 15. 4. 01 (odpovídá doc. Petruželka).

Kromě atestace z oboru „Klinická onkologie“ doporučuje výbor zavedení funkční specializace z onkologie, jejíž obsah je však nutno předjednat s příslušnými odborníky. Výbor navrhuje oslovit odborníky těchto oborů:

gynekologie – doc. L. Rob

urologie – MUDr. Nová

hrudní chir. – prof. Král

břišní chir. – prof. M. Pešková

ORL – prof. Jan Betka

stomatochir. – prof. J. Mazánek

pneumologie – prof. Kolek

radioterapie – MUDr. H. Stankušová

ortopedie – ?

9. MUDr. Příbylová seznámila výbor s připomínkami k bodovému hodnocení jednotlivých výkonů v klinické onkologii. Kompletní seznam zpracuje do 20. 4. 01.

10. Výbor ČOS byl požádán redakcí ČLČ o vyjádření stanoviska k problematice devitalizace. Bylo rozhodnuto, že stanovisko bude vypracováno koncem června, až po zhodnocení prvních výsledků klinického zkoušení. Návrh stanoviska vypracuje doc. Žaloudík, profesora Petráška bude informovat doc. Petruželka.

11. Korespondence:

Výbor požádán o stanovisko k návrhu ředitele doc. Rýznara na zřízení Centra klinické onkologie ve FN-Olomouc. Výbor doporučuje zvážit naplnění všech podmínek (včetně dostatečného počtu kvalifikovaných pracovníků), jinak nemá námitky. Odpověď vypracuje prof. Klener.

Ředitelka ÚZIS Mgr. Mazánková informuje o nové klasifikaci nádorů, která vyšla v r. 2000. ČOS by měla požádat MZ o zabezpečení překladu a její následné povinné zavedení. Výbor tak učiní na příštím zasedání (až po projednání návrhu na její zavedení Radou NOR 26. 4. 01).

Výboru došly 2 návrhy na cenu ČOS.

Abrahámová a spol.: Atlas nádorů prsu

Vorlíček a spol.: Praktická onkologie.

Po diskusi navrhuje výbor na cenu ČOS monografii Vorlíček a spol., monografii Abrahámová a spol. navrhuje na cenu České lékařské společnosti.

Výbor byl požádán Nadací Paula Janssena, aby navrhl členy posuzovatelské komise pro obor onkologie, výměnou za dosavadní členy, kterým skončilo funkční období. Byli navrženi: Doc. Petruželka, prim. Jelínková, prim. Fínek, doc. Vyzula z Brna.

12. Různé:

Výbor doporučuje úhradu jehel Penfine z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Dopis zašle prof. Klener.

Termín dalšího zasedání výboru ČOS byl stanoven na středu 30. května 2001 v 19,00 hodin v Brně, u příležitosti BOD.

V Praze 10. dubna 2001

Za ČOS: doc. MUDr. Luboš Petruželka, vědecký sekretář
prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., předseda