

MOBILIZACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK A MOŽNÉ POSTUPY U TZV. OBTÍŽNĚ MOBILIZOVATELNÝCH NEMOCNÝCH

MOBILIZATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND POSSIBLE STRATEGIES IN THE HARD-TO MOBILIZE PATIENTS

CETKOVSKÝ P.

Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice Plzeň

Souhrn: Vysoké dávky chemoterapie s následnou transplantací autologních kmenových buněk krvetvorby se staly běžnou léčebnou metodou pro mnoho nemocných s malignitami. Lékař pečující o tyto nemocné po transplantaci se nyní setkává s nezvykle rychlým přihojením štěpu, nicméně asi u 10% až 40% nemocných lze pozorovat prodloužení doby, než dojde k normalizaci hodnot trombocytů (na rozdíl od leukocytů, kde normalizace hodnot je u většiny nemocných promptní). Rychlost přihojení štěpu závisí na množství transplantovaných CD34+ buněk na kilogram hmotnosti. Za ideální dávku CD 34+ buněk, která vede k rychlému přihojení trombocytů i neutrofilních leukocytů, je nejčastěji považována hodnota více než 2.5×10^6 CD 34+ buněk na kg hmotnosti příjemce. Nemocní, u kterých po prvním mobilizačním schématu opakovanými aferézami nelze nastřídat toto tzv. ideální množství (více než 2.5×10^6 CD 34+ buněk /kg), se označují jako obtížně mobilizovatelní nemocní. Strategie, které mohou použít transplantační centra u těchto obtížně mobilizovatelných pacientů, jsou následující:

1. Neprovádět vysocedávkovanou léčbu.
2. Provést vysocedávkovanou léčbu, ale transplantovat méně než ideální množství CD 34+ buněk.
3. Provést remobilizaci za využití stejného mobilizačního protokolu, který byl již použit poprvé (identický postup v časovém odstupu může vyústit ve sklizeň přibližně stejného množství CD 34+ buněk), nebo rozdílného mobilizačního protokolem.
Pro remobilizaci jiným mobilizačním schématem lze použít následující postupy:
 - a) Remobilizace kombinací mobilizačních prostředků (chemoterapie s cytokiny).
 - b) Remobilizace aplikací zvýšené dávky cytokinu.
 - c) Remobilizace kombinací cytokinů působících v časně i pozdní fázi hematopoézy (PIXY 321 nebo kombinace G-CSF se stem cell factorem, interleukinem 3, GM-CSF, trombopoetinem, erythropoetinem, atd).
 - d) Remobilizace jinou formou rekombinovaného G-CSF.
4. Provést odběr kostní dřeně.

V práci jsou detailně probírána jednotlivá mobilizační schémata a doporučení jejich použití, rovněž je upozorněno na jejich finanční náročnost či obtížnou proveditelnost v praxi.

Klíčová slova: mobilizace kmenových buněk krvetvorby - remobilizace kmenových buněk krvetvorby - autologní transplantace kmenových buněk krvetvorby - cytokiny - vysoké dávky chemoterapie - granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

Abstract: Autologous blood stem cell transplantation to support high-dose chemotherapy has become commonplace for a variety of tumor types. Transplant physicians have become accustomed to rapid hematopoietic engraftment, but 10%-40% of patients have delayed platelet engraftment (neutrophil recovery is prompt in nearly all patients). Rapidity of engraftment is directly correlated to the number of CD34+ cells infused per kilogram body weight. The optimal cell dose for rapid hematopoietic recovery for neutrophils (and in the majority of patients also for platelets) is 2.5×10^6 CD34+ cells/kg. Patients who, after repeated aphereses, do not reach this ideal cell dose (more than 2.5×10^6 CD34+ cells/kg) are defined as „hard-to mobilize“ patients. Strategies used by transplant centers in these bad mobilizers are:

1. Do not perform this treatment strategy.
2. Performe transplantation with a less than ideal CD34+ cell dose.
3. Performe remobilization with the identical (identical regimen separated in time from the first mobilization usually yields the same number of CD34+ cells) or different mobilizing regimen.
For remobilization with different regimens, we can use:
 - a) Remobilization with combination of chemotherapy plus cytokines.
 - b) Remobilization using dose-escalation of available cytokines.
 - c) Remobilization using the combination of early- and late-acting cytokines (PIXY 321 or G-CSF in combination with stem cell factor, interleukin 3, GM-CSF, thrombopoetin, erythropoetin, etc).
 - d) Remobilization using a different form of G-CSF.
4. Performe bone marrow harvesting.

Detailed mobilization schemes, recommendation, as well as the expense and practicality of all these options, are discussed.

Key words: mobilization of hematopoietic stem cells - remobilization of hematopoietic stem cells - autologous hematopoietic stem cell transplantation - cytokines - high-dose chemotherapy - granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

Podstata vysocedávkované chemoterapie

Vysoké dávky chemoterapie (high-dose chemotherapy - HDCH) s následnou transplantací autologních kmenových buněk krvetvorby (blood stem cell transplantation - BSCT) se staly běžnou léčebnou metodou nejen pro mnoho nemocných s hematologickými malignitami (hlavně s leukémiemi a lymfomy), nýbrž i pro některé vybrané nemocné s tzv. solidními nádory (např. tumory varlat, centrálního nervového systému,

prsu, apod.). Použití vysokých dávek chemoterapie, často až na hranici maximální tolerované dávky, vychází z experimentálně i klinicky ověřené koncepce tzv. dose intensity: vyšší dávka vyprodukuje větší léčebný účinek. Letální hematologickou toxicitu těchto obrovských dávek lze efektivně obejít pomocí BSCT (hematopoetické buňky se předem odeberou a kryokonzervují). Bez autologní BSCT by totiž po podání HDCH došlo nejen k likvidaci nádoru (v ideálním případě,

ale i k mnoho týdnů trvajícímu akutnímu dřeňovému útlumu. Důsledkem BSCT je tedy urychlení rekonstituce hematopoese, čímž se doba těžké dřeňové aplázie zkracuje ze 4 a více týdnů i na 8 a méně dní.

Mobilizace CD 34+ buněk

Hematopoetické kmenové a progenitorové buňky lze použitím průtokové cytometrie poměrně rychle a spolehlivě identifikovat dle přítomnosti typického antigenu na jejich povrchu, označovaného jako antigen CD 34 (vyskytuje se jen na nejvíce nezralých hematopoetických buňkách: od kmenových buněk až po progenitorové). Hematopoetické kmenové či progenitorové buňky se donedávna získávaly takřka výhradně z kostní dřeně. Nemožnost získat dostatečné množství CD 34+ buněk, například následkem postižení kostní dřeně nádorem či předcházejícím ozařováním, vedlo k hledání alternativního zdroje těchto buněk. Zjistilo se, že CD 34+ buňky cirkulují za normálních podmínek (tzv. steady-state či resting state) ve velmi malém množství i v periferní krvi. Velkým objevem bylo poznání, že tyto CD 34+ buňky se mohou vyplavit do periferní krve až ve 100x vyšším počtu během odeznívání aplázie po podání vysokých dávek některých cytostatik. Převratně však bylo zjištěno, že při leukocytóze, která se objeví jako následek podávání rekombinantních hematopoetických růstových faktorů stimulujících granulocytární kolonie: granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) či granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), dochází nejen ke zvýšení počtu cirkulujících zralých leukocytů, ale též CD 34+ buněk. G-CSF či GM-CSF se však používají nejen k mobilizaci kmenových buněk (což je tématem tohoto sdělení), ale jejich další významnou indikací (u nemocných, u nichž je plánována HDCH) je podávání v období po BSCT (7,8,24). Od roku 1986 se počaly poprvé klinicky k transplantacím používat též CD 34+ buňky získané z periferní krve (peripheral blood stem cell transplantation - PBSCT). K vyplavení CD 34+ buněk z kostní dřeně se provádí tzv. mobilizace podáváním cytokinů (nejčastěji G-CSF) či aplikací kombinace chemoterapie a cytokinu. V současnosti se při autologních transplantacích tohoto zdroje užívá v naprosté většině, odběr kostní dřeně se provádí často jen v případech, kdy nelze buňky z kostní dřeně mobilizovat do periferní krve. PBSCT (v porovnání s transplantací kostní dřeně) vede k rychlejšímu přihojení štěpu (a tím ke zkrácení doby aplázie), navíc teoreticky může vyústit i ve snížení kontaminaci transplantátu nádorovými buňkami.

Dávky CD 34+ buněk

Lékař pečující o nemocné po PBSCT se nyní setkává s nezvykle rychlým (v porovnání s minulostí) přihojením štěpu (tzv. engraftment). K normalizaci hodnot leukocytů může dojít i již za 8-10 dní po PBSCT, trombocytů za 10-12 dní (léčbou navozená těžká aplázie tedy může v ideálním případě trvat pouze 4-6 dní). Nicméně asi u 10 % až 40 % nemocných lze pozorovat prodloužení doby, než lze konstatovat engraftment pro trombocyty (na rozdíl od leukocytů, kde normalizace hodnot je u naprosté většiny nemocných promptní). Několika studiemi bylo objasněno, že rychlost a kvalita přihojení štěpu (posuzovaná dle normalizace hodnot leukocytů a trombocytů v krvi) je přímo závislá na množství transplantovaných CD34+ buněk. Tyto studie většinou jako množství pro optimálně rychlý engraftment (dosažení hodnot leukocytů více než $1 \times 10^9/l$ a trombocytů více než $50 \times 10^9/l$ ve třech po sobě následujících dnech bez prováděné substituce) doporučují tzv. ideální dávku: více než 5×10^6 CD 34+ buněk na kg hmotnosti příjemce (CD 34+ buněk/kg) (4,5,24). Po podání této dávky se nejméně u 90% nemocných hodnoty leukocytů a krevních destiček normalizují do 2 týdnů (4,16,35,37). Jiné skupiny jako ideální dávku, nutnou k záchraně nemocného po myeloablativní chemoterapii, doporučují hodnoty alespoň $2,5 \times 10^6$ CD 34+ buněk/kg (7,15). Po podání tohoto množství CD 34+ buněk u 95 % pacientů dojde k normalizaci hod-

not leukocytů a trombocytů do 3 týdnů (4,5,14,37). Transplantovat méně než 2×10^6 CD34+ buněk/kg je spojeno s opožděným návratem normálních hodnot, především trombocytů (a z tohoto vyplývají i komplikace, hlavně krvácivé) (7,15). Jako minimální dávka, se kterou lze ještě PBSCT provést, se uvádí hodnota 1×10^6 CD 34+ buněk/kg. Jde však o postup nebezpečný, neboť tyto pacienti trpí velmi často prodlouženou trombocytopenií a tudíž až u 25% nemocných se mohou objevit život ohrožující komplikace (hlavně krvácivé). Problémem zůstává nejednotnost postupů při stanovování CD 34+ buněk (26,30). Vzhledem k tomu, že není doposud používán jednotný protokol, tak výsledky mezi pracovišti se mohou diametrálně lišit. Optimistické je, že se počínají objevovat první podrobné pokyny, jak postupovat při měření CD 34+ buněk, na našem pracovišti používáme kriteria (31) vypracovaná ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering).

Faktory způsobující nemožnost získat dostatečné množství CD 34+ buněk

Na mnoha světových renomovaných pracovištích jsou faktory, které způsobují nemožnost získat ideální počet CD 34+ buněk pro PBSCT (po provedení vícečetných aferéz) usilovně studovány. Podrobné analýzy (např. 10,14,20) prokázaly, že špatnou mobilizovatelnost CD 34+ buněk nejčastěji způsobuje:

- opakovaná předchozí chemoterapie (více než 6 cyklů)
- i krátkodobá aplikace některých cytostatik (především alkylační látky, např. BCNU, chlorambucil, melphalan, ale i např. deriváty platiny, atd.)
- předcházející radioterapie (především na oblasti pod bránicí)
- někdy jsou uváděny i další faktory, např. vyšší věk (nad 50 let), postižení kostní dřeně nádorovým onemocněním, některá onemocnění (např. M. Kahler) atd.

Na vysocedávkovanou chemoterapii je nutno myslet od prvního kontaktu s nemocným a tomu podřídít i celkovou léčebnou strategii

Vzhledem k přítomnosti výše popsaných faktorů, způsobujících nemožnost sklídit dostatečné množství CD 34+ buněk, je nutno na tento druh léčby (HDCH a PBSCT) myslet od prvního kontaktu s nemocným a léčebnou strategii od samého počátku stavět i s ohledem na možnou HDCH. V praxi to znamená nejen vyhnout se některým cytostatikům (viz výše), ale též (s ohledem na to, že i opakované cykly chemoterapie mohou vést k selhání mobilizace) se snažit provést sklizeň CD 34+ buněk jak nejdříve to jde, často již po prvních cyklech chemoterapie (většinou po průkazu, že kostní dřeň není infiltrována). K mobilizaci totiž není nutné používat speciální mobilizační (cytostatická) schemata, protože k vyplavení CD34+ buněk může posloužit i tzv. disease-specific therapy: některý běžně používaný cytostatický protokol (pochopitelně s následným podáváním cytokinu, nejčastěji opět G-CSF). Má to tu výhodu, že kombinace cytostatik je vyzkoušená a dostatečně účinná na daný tumor (což nemusí být u cytostatik používaných jen za účelem mobilizace).

Provádění mobilizace

1. Mobilizace samotným cytokinem

Optimální postup pro mobilizaci nebyl doposud jasně stanoven. Zřejmě nejšetnější možností je podávání samotného cytokinu (nebo kombinace cytokinů) a mnohá pracoviště tento postup (navzdory tomu, že nemusí vést vždy k nejvyšším výtěžkům při „sklizni“) využívají. Navíc, za některých situací je aplikace cytostatika dokonce nevhodná (například u některých dětí, zdravých dárců při allogenních transplantacích, u nemocných s nízkými hodnotami krevního obrazu, atd). Jak již bylo opakovaně zmíněno, hematopoetickým růstovým

faktorem nejčastěji používaným k mobilizaci CD 34+ buněk je G-CSF. T.č. jsou u nás běžně používány dva rekombinantní faktory stimulující růst granulocytárních kolonií: lenogras-tim (je glykosylován na stejném místě jako molekula přiroze-ného G-CSF) a filgrastim (není glykosylován). Z některých teoretických poznatků se lze domnívat, že glykosylace může teoreticky ovlivnit fungování cytokinů (glykosylovaná forma G-CSF je in vitro stabilnější). Toho se snaží využít některé studie k průkazu hypotézy, že mobilizační schopnosti glykosy-lovaného G-CSF (lenograstimu) jsou lepší (17,18,33) než u G-CSF bez glykosylace (blíže tato problematika bude roz-vedena v kapitole: Remobilizace).

G-CSF se k mobilizaci nejčastěji aplikuje v dávce 5 - 10 $\mu\text{g/kg/den}$. Podávání se většinou začíná 4 - 5 dní před zaháje-ním „sklizné“. Jako čas první aferézy se většinou určí den, kdy množství cirkulujících progenitorů v periferní krvi poprvé pře-sáhne počet $10 \text{ CD } 34+ \text{ buněk}/\mu\text{l}$, současně většinou za před-pokladu, že hodnota leukocytů je vyšší než $1 \times 10^9/\text{l}$ a trom-bocytů více než $20 \times 10^9/\text{l}$. (Aferézy se mohou započít i bez ohledu na množství cirkulujících progenitorů v tom okamžiku, kdy se dosáhne předem určené hodnoty leukocytů v peri-ferní krvi - např. $4 \times 10^9/\text{l} - /34/$). V tomto modelovém případě však nejde o typickou mobilizaci samotným cytokinem, neboť předchází chemoterapie: tento postup je zmiňován v této sou-vislosti jenom k demonstraci jiného protokolu při stanovení počátku aferéz). Stejná dávka se potom (při obou postupech) aplikuje i nadále, poslední G-CSF se podá v den konečné afe-rézy (průměrně se tedy G-CSF aplikuje 5-8 dní).

Není doposud jasné, zda denní dávku G-CSF podávat najed-nou, či celkové množství rozdělit a podávat dvakrát denně. Některé studie (např. 1) dosáhly významně lepších výtěžků tehdy, když dávka byla rozdělena a podávána každých dva-náct hodin.

Teoreticky je možno i k první mobilizaci využít kombinaci cyto-kinů, nejde však o běžný postup: používají se například kom-binace G-CSF se stem cell factorem, dále s interleukinem 3, GM-CSF, trombopoetinem, erytropoetinem, rovněž např. monoterapie aplikací PIXY 321, atd. (navzdory faktu, že jde o postupy aplikované k první mobilizaci se obecně předpoklá-dá, že tato schémata budou efektivní i při remobilizaci: viz kapi-tola Remobilizace). Velmi perspektivní je především stem cell factor (SCF). Jedná se o velmi časně působící hematopoetický cytokin, jehož nejpravděpodobnější funkcí je podporovat pro-liferaci a přežívání pluripotentních progenitorových buněk. SCF rovněž zvyšuje schopnost „zadávání“ pro jednotlivé linie a následnou diferenciaci (jako odpověď na lineárně specifické cytokiny). Bylo prokázáno, že aplikace SCF zvyšuje množství cirkulujících leukocytů (včetně progenitorů a prekursorů). SCF se začal podávat i v klinické praxi (2,12), nejlepších výsledků bylo dosaženo tehdy, když aplikace SCF předcházela podá-vání G-CSF: aplikace SCF $10 \mu\text{g/kg/den}$ 3 dny je následováno 7denním podáváním G-CSF $10 \mu\text{g/kg/den}$ (13). Jsou tedy k dis-pozici první studie, které prokazují, že použití SCF (v kombi-naci s G-CSF) může vyústit v mobilizaci většího množství CD 34+ buněk (ve srovnání s G-CSF samotným) i u těžce předlé-čených nemocných (3). Při aplikaci SCF (neboť SCF rovněž indukuje proliferaci a aktivaci žirných buněk) je, jako preven-ce alergické reakce, doporučováno premedikovat nemocné podáváním antihistaminik a beta-agonistů.

2. Mobilizace kombinací cytostatika a cytokinu

Mnohé studie prokázaly, že k největším výtěžkům CD 34+ buněk vede používání kombinovaného postupu: kombinace nejčastěji znamená, že po aplikaci chemoterapie následuje podávání cytokinu. Schémat využívajících kombinaci che-moterapie a cytokinu je nepřehledná řada. V zásadě platí, že pokud se používá kombinovaný postup, lze aplikovat dávku G-CSF i nižší než většinou doporučovaných $10 \mu\text{g/kg/den}$, např. $300 \mu\text{g/den}$ (15,20), což může vést k finanční úspoře při použití tohoto kombinovaného postupu. Nejčastějším cyto-

statikem je cyklofosfamid (CPA), který se používá v rozlič-ných dávkách (4,15,19,20): od 7 g/m^2 , přes $3-4 \text{ g/m}^2$ až po 1.5 g/m^2 . Tyto nižší dávky nemají sice tak významný mobili-zační účinek, ale jejich výhodou je především menší toxicita (a tedy i méně komplikací, včetně snížení mortality). Z dalších používaných cytostatik jsou časté protokoly kombinující CPA a etoposid (10), ifosfamid, etoposid (VP-16) a epirubicin (27) či paclitaxel a CPA. Jak už bylo zmíněno výše, lze použít k mobilizaci i některá běžná chemoterapeutická schemata (tzv. disease-specific therapy), např. u nemocných s karcinomem prsu kombinace cyklofosfamid a adriamycin či u nemocných s maligními lymfomy např. kombinaci postavenou na bázi ifos-famidu a VP-16 (25).

Jsou rovněž uzavřeny první studie, v nichž autoři použili k mobilizaci SCF spolu s G-CSF, poprvé nebyla tato kombi-nace cytokinů použita bez chemoterapie, ale SCF a G-CSF byly aplikovány po podání CPA (35). Výsledky prokázaly, že použití SCF, v kombinaci s G-CSF, může vyústit v mobiliza-ci většího množství CD 34+ buněk (ve srovnání s G-CSF samotným), léčebné schéma bylo následující: CPA 3 g/m^2 v den 1, cytokiny od dne 3: G-CSF $5 \mu\text{g/kg}$ a SCF (nejlepších výsled-ků bylo dosaženo použitím dávky $15 \text{ a } 20 \mu\text{g/kg}$), hematopo-etické růstové faktory byly aplikovány denně až do doby, kdy hod-nota leukocytů dosáhla $4 \times 10^9/\text{l}$, kdy u všech nemocných byla provedena aferéza.

3. Mobilizace samotným cytostatikem

Aplikace samotného cytostatika se k mobilizaci CD 34 + buněk, vzhledem k relativně nižším výtěžkům (a tím nutnosti opakovaných aferéz či aplikací dalších mobilizačních sché-mat), používá méně často. Tento postup je možno aplikovat především u některých hematologických malignit vycházejí-cích z myeloidní řady (akutní či chronická myeloidní leuké-mie), důvodem jsou obavy z podávání stimulačních faktorů granulocytární řady (G-CSF či GM-CSF) vzhledem k jejich možné (ale zatím doposud jasně neprokázané) stimulaci mye-loidní nádorové linie. V těchto případech se potom podávají vysoké dávky CPA ($3-7 \text{ g/m}^2$) či VP-16 (většinou $1-2 \text{ g/m}^2$).

Co s nemocnými, u kterých nelze získat dostatečné množ-ství CD 34+ buněk?

Získat ideální množství CD 34+ buněk se podaří u většiny nemocných. Existuje však (a i v budoucnosti zřejmě bude exi-stovat) přibližně 10% nemocných (4,5,35,37), u kterých se běž-nými mobilizačními postupy nepodaří dosáhnout nastřádání tzv. ideálního množství CD 34+ buněk. Avšak vzhledem k tomu, že v současné době se tento léčebný postup plánuje i u velkého množství v minulosti silně předlčených nemoc-ných, tak lze předpokládat, že nyní počet nemocných, kteří nepůjdou uspokojivě „sklidit“ (budou tedy obtížně mobilizo-vatelní: první mobilizací se získá méně než $2.5 \times 10^6 \text{ CD } 34+ \text{ buněk/kg}$) bude podstatně vyšší než v budoucnosti, kdy na HDCH a PBSCT se bude myslet již od samého počátku. Dále navržený postup může být však použit nejen v současnosti pro nyní se vyskytující těžce předlčené nemocné, ale i v budoucnosti u těch nemocných, u nichž sice bude HDCH a PBSCT plánována od začátku, ale přesto nepůjdou sklidit, neboť zřej-mě i v budoucnosti budou existovat tzv. klasickými postupy nezmobilizovatelní (nebo jen velmi obtížně zmobilizovatelní) nemocní. Co potom?

Definice obtížně mobilizovatelného pacienta

Mnoho autorů se opakovaně snažilo o co nejvýstižnější defi-nici tzv. obtížně mobilizovatelného pacienta: t.j. nemocného, u kterého lze obtížně dosáhnout mobilizace ideálního množ-ství kmenových buněk krvetvorby (obtížně mobilizovatelný, v anglickém písemnictví: hard-to mobilize patients, bad mobi-lizers, atd). Nejběžnější a nejjednodušší definice v současnos-ti zní následovně: obtížně mobilizovatelný je takový nemoc-ný, u kterého po prvním mobilizačním schématu opakovaný-

mi aferézami nelze nastřádat tzv. ideální množství (tedy alespoň 2.5×10^6) CD 34+ buněk na kilogram hmotnosti příjemce (7).

Jakou strategii mohou použít transplantační centra v případě, že nedosáhnou tzv. ideálního množství CD 34+ buněk?

1. Neprovádět vysocedávkovanou léčbu.

Technicky nejjednodušším, nejlevnějším ale současně většinou nejhorším řešením (je-li indikace provedení k HDCH a BSCT) je tento druh léčby zrušit a hledat alternativní postup (jiné standardně dávkované léčebné schéma, apod.).

2. Provést vysocedávkovanou léčbu, ale transplantovat méně než ideální množství CD 34+ buněk.

Poměrně často lze provést HDCH s následnou PBSCT, během níž se převede méně než ideální množství CD 34+ buněk (tedy méně než 2.5×10^6 CD 34+ buněk/kg). Tato strategie je úspěšná hlavně u nemocných léčených méně intenzivními předtransplantačními přípravnými protokoly, jako jsou například vysoké dávky melfalanu u pacientů s mnohočetným myelomem či kombinace BEAM (BCNU, VP-16, cytosine-arabinosid a melfalan) u nemocných s maligními lymfomy. Nevhodným (někdy až velmi nebezpečným) se jeví tento postup použít u velmi intenzivních režimů s dávkami cytostatik často až na samé hranici maximálně tolerované dávky (např. u solidních nádorů, akutních leukémií, atd). Nicméně, jak již bylo zmíněno dříve, u nezanedbatelné části nemocných může po transplantaci menší než ideální dávky dojít k významně opožděnému návratu hodnoty leukocytů i trombocytů do normy, což může být spojeno s vyšší mortalitou i finančními náklady (opakované transfuze trombocytů, delší aplikace antibiotik, prodloužení hospitalizace, atd).

3. Remobilizace (opakovaná mobilizace)

Nelze-li HDCH s PBSCT zrušit, či použít k výkonu menší množství CD 34+ buněk než ideální, tak k nastřádání dostatečného počtu CD34+ buněk je nevhodnější provést opakovanou mobilizaci progenitorových a kmenových buněk (tzv. remobilizaci). Předem by však vždy individuálně měla být porovnána finanční náročnost remobilizace s odhadovanými náklady způsobenými prodloužením doby normalizace hodnot leukocytů a krevních destiček (a z toho plynoucími komplikacemi).

A) Remobilizace stejným postupem jako poprvé

Remobilizaci lze provést za využití stejného mobilizačního protokolu, který byl již použit poprvé. Tento postup využívá teoretického předpokladu, že identický postup (který je často na pracovištích rutinně zaběhnut a při jehož použití lze dobu sklizně dobře předpovědět) v časovém odstupu vyústí ve „sklizeň“ (harvest) přibližně stejného či vyššího (dokonce i dvojnásobného) množství CD 34+ buněk (37). Pro zjednodušení triviální příklad: pokud se získá po první mobilizaci provedením 5 aferéz 1.5×10^6 CD 34+ buněk/kg, tak po čase lze stejným postupem s velkou pravděpodobností získat nejméně dalších 1.5×10^6 CD 34+ buněk/kg (tudíž celkově relativně slušný počet CD 34+ buněk pro provedení „bezpečné“ PBSCT).

B) Remobilizace jiným protokolem

a) Remobilizace kombinací mobilizačních prostředků (chemoterapie s cytokinem)

1. Remobilizace přidáním dalšího mobilizačního prostředku
Tento kombinovaný postup je možné použít především u nemocných, u kterých nedošlo k dostatečné mobilizaci po monoterapii cytokinem (či po vyjimečně prováděné mobilizaci samotným cytostatikem). V této situaci může podání chemoterapie s následnou aplikací cytokinu vést ke sklizni vyššího počtu CD 34+ buněk, než bylo nastřádáno po samot-

ném cytokinu (či cytostatiku), použitým k první mobilizaci. Paradoxně se může úspěšně užít i stejný hematopoetický růstový faktor (nebo cytotoxický lék), který selhal v monoterapii před první neúspěšnou mobilizací. Je ale nutno zvážit všechna rizika, neboť tato strategie teoreticky může vést k vyšší morbiditě.

II. Remobilizace změnou chemoterapie v kombinaci se stejným cytokinem (27,35)

Bylo-li k mobilizaci aplikováno nejpoužívanější cytostatikum: CPA, tak lze teoreticky v budoucnosti použít nejen jiná cytostatika v monoterapii (VP-16, paclitaxel, docetaxel, atd), ale stejně tak i kombinaci těchto chemoterapeutik (nejčastěji opět s CPA). Je však nutno postupovat individuálně a řídit se i anamnézou nemocných: například u těžce předléčených nemocných nepodávat protokoly obsahující některé léky, které poškozují kmenové buňky (např. deriváty platiny, melfalan, atd). Nevhodné může též být podání extrémně vysokých dávek CPA (7 i více g/m²) navzdory tomu, že CPA je považován za lék takřka nepoškozující jak kmenové hematopoetické buňky, tak ani mikroprostředí v kostní dřeni.

Objevují se však první zprávy, které naznačují, že nejen chemoterapeutika, ale že i kombinace cytokinů (např. G-CSF) s cytostatiky by mohla paradoxně vést k prohloubení poškození kmenových buněk (32). Vbrzku na tomto poli je možné očekávat další překvapivá zjištění.

b) Remobilizace aplikací zvýšené dávky cytokinu.

Tento postup se často podaří, neboť se v některých studiích prokázalo, že schopnost G-CSF mobilizovat CD 34+ buňky z kostní dřeně do periferní krve je závislá na dávce: vyšší dávka G-CSF má za následek vyplavení vyššího počtu CD 34+ buněk (37). V současnosti probíhají studie porovnávající dávky G-CSF v rozmezí od 10 do 40 µg/kg. První výsledky ukázaly, že vyšší dávky G-CSF (v rozpětí 16-32 µg/kg/den), i u obtížně mobilizovatelných nemocných s karcinomem prsu či mnohočetným myelomem, u kterých často selhaly mobilizace standardními dávkami cytokinů, vedly k nastřádání ideální hodnoty CD 34+ buněk/kg (11,36,37). Z prvních závěrů tedy vyplynulo, že vyšší remobilizační dávka G-CSF skutečně zlepšila výtěžek CD 34+ buněk. Avšak u tohoto postupu především je nutno, vzhledem k vysokým dávkám velmi drahých cytokinů, přísně individuálně zvažovat, zda je tato léčba finančně výhodná (pomineme-li etické hledisko a budeme-li se řídit i finančními limity našeho zdravotního systému). V kalkulaci je nutno vzít v potaz, že po transplantaci nižšího než ideálního množství CD 34+ buněk, získaných první mobilizací, bude nutno provádět intenzivnější podpůrnou léčbu, především podávat vyšší počet rovněž drahých trombokonzentrátů a širokospektrých antibiotik. Bohužel studie, v nichž by byla provedena finanční analýza obou strategií, zatím nebyly publikovány.

c) Remobilizace kombinací cytokinů (většinou působících jak v časné, tak i pozdní fázi hematopoézy)

V poslední době byly prováděny velmi zajímavé studie, které používají k mobilizaci kombinace rozličných hematopoetických růstových faktorů. Vývoj v této oblasti jde velmi rychle dopředu a zde jsou uváděny výsledky některých dostupných studií bez nároku na úplnost. V dále zmiňovaných studiích byly postupy sice většinou použity jako první mobilizační schémata, nicméně lze odůvodněně předpokládat, že budou úspěšné i jako remobilizační protokoly.

Stem cell factor (SCF)

Jde o zřejmě velmi perspektivní cytokin, speciálně v kombinaci s G-CSF. Nedávno bylo publikováno úspěšné dávkování i u silně předléčených nemocných (13): SCF 10 µg/kg/den: 1.až 3.den, G-CSF 10 µg/kg/den: 4.-10. den (podrobněji v oddíle Mobilizace).

GM-CSF

Další možností je použít kombinaci G-CSF a GM-CSF (39), dobrých výsledků bylo dosaženo použitím následujícího schématu: GM-CSF 5 µg/kg/den 1. - 12. den a G-CSF 5 µg/kg/den ve dnech 7.-12. (pokud byl podáván G-CSF jako první a GM-CSF až následně, tak výtěžky CD 34+ buněk byly horší).

Interleukin 3 (IL-3)

Dalším cytokinem je IL-3, který se k mobilizaci nejčastěji používá v kombinaci s G-CSF. Příklad úspěšného dávkování byl nedávno publikován (22): po ukončení cyklu chemoterapie ihned zahájit IL-3 v dávce 5 µg/kg/den s.c. po dobu 5 dní a dále pokračovat v aplikaci G-CSF v dávce 10 µg/kg/den. Po vyplenění dostatečného množství CD 34+ buněk se zahájí aferézy, poslední dávka G-CSF se podá v den ukončení leukaferéz.

PIXY 321

Jako PIXY 321 je označován fúzní protein, který sestává z GM-CSF a IL-3. Jsou zkoumány různé dávky (50, 125, 250, 500, 750 a 1000 µg/m² jako kontinuální infuze do ukončení aferéz) (6,12).

Trombopoetin, erythropoetin, apod.

Ve stadiu klinických zkoušení jsou rovněž rozličné kombinace G-CSF s trombopoetinem či erythropoetinem, či některými dalšími cytokiny.

d) Remobilizace jinou formou rekombinovaného G-CSF

Pro použití v klinické praxi jsou t. č. na našem území registrovány dva rekombinantní faktory stimulující růst granulocytárních kolonií. Jde jednak o lenograstim (Granocyte®, Rhone-Poulenc Rorer), který je získáván z buněk ovarií čínské křečka a je glykosylovaný na stejném místě jako molekula přirozeného G-CSF. Druhým produktem je filgrastim (Neupogen®, Amgen), který je produktem E.coli a není glykosylován (obsahuje navíc Met skupinu na N terminálním konci peptidového řetězce). Předpokládá se, že glykosylace by mohla významně ovlivnit funkce cytokinů (usuzuje se například ze závěrů některých studií prokazujících, že neglykosylovaný erythropoetin je in vivo málo účinný, neboť je vychytáván játry). Další provedené studie (např. 9) též prokázaly, že in vitro je glykosylovaná forma G-CSF stabilnější. Klinické studie na zdravých dobrovolnících prokázaly vyšší mobilizační efekt glykosylovaného G-CSF: lenograstimu (17,18,33). Některé další prováděné studie na pacientech (2,23,29) neprokázaly

vyšší efekt glykosylovaného G-CSF: efekt obou G-CSF byl stejný. Nicméně závěry některých publikací nabízejí zajímavou hypotézu: právě u špatně mobilizovatelných nemocných by vyšší účinnost lenograstimu (zjištěná v těchto studiích) mohla mít klinický význam (33).

4. Provést odběr kostní dřeně.

Další možností je nepokoušet se opětovně o získání PBSC, nýbrž provést odběr kostní dřeně.

Závěr

Používání nejrůznějších hematopoetických cytokinů bude v budoucnosti při získávání dostatečného počtu hematopoetických kmenových a progenitorových buněk krvetvorby ještě nejspíše stoupat, neboť se stále objevují další možná použití. Nové objevy by mohly vést k tomu, že i z jedné aferézy by se mohlo nasbírat množství PBSC dostatečné k provedení i více HDCH a PBSCT. Tím by odpadl problém remobilizace či obtížně mobilizovatelných nemocných, neboť v tom případě by nemuselo být na škodu ani získání menšího než ideálního množství CD 34+ buněk: jejich počet bude možno expanzí (viz dále) proměnit v množství významně vyšší.

Selekce a expanze PBSC

Navzdory aplikaci PBSC s potransplantačním podáváním G-CSF (či GM-CSF) přetrvává po PBSCT období 6-12 dnů, tzv. „neutropenické okno“ (neutropenic window). Je způsobeno tím, že PBSC potřebují takto dlouhé období k diferenciaci, vyzrání a uvolnění do periferní krve. Jednou z dalších možností, jak zkrátit (či odstranit) toto „neutropenické okno“, které je vlastně již jen zbytkem z jinak hrozného období těžké aplázie po HDCH (které by se dostavilo bez již dříve zmíněných postupů: PBSCT a aplikace G-CSF), je provést manipulaci se štěpem. V současnosti se jako přínosné jeví např. udělat selekci a následnou expanzi (kultivaci PBSC v plastických vracích za přítomnosti cytokinů, což vede k mnohonásobnému pomnožení progenitorových buněk). Transplantace těchto expandovaných buněk (obsahujících až 70 % promyelocytů, myelocytů a metamyelocytů) po PBSC (například v den +1) vede ke zkrácení doby i tíže aplázie (28,37,38).

Práce byla částečně podporována grantem IGA MZd ČR č. 2998-4

Literatura

1. Arbona, C., Prosper, F., Benet, I. et al.: Comparison between once a day vs twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in normal donors for allogeneic PBPC transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 22, 1998, s. 39-45.
2. Arriba, F., Ortuño, F., Heras, I. et al.: Prospective randomized study comparing the efficacy of bioequivalent doses of filgrastim and lenograstim for mobilizing peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Bone Marrow Transplant.*, 19, S1, 1997, S110 (Abstract No.P439).
3. Basser, R.L., To, L.B., Begley, C.G. et al.: Rapid hematopoietic recovery after multicycle high-dose chemotherapy: enhancement of filgrastim-induced progenitor-cell mobilization by recombinant human stem cell factor. *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, s. 1899-1908.
4. Bensinger, W.I., Appelbaum, F., Rowley, S. et al.: Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J. Clin. Oncol.*, 13, 1995, s. 2547-2555.
5. Bensinger, W.I., Longin, K., Appelbaum, F. et al.: Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): An analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br. J. Haematol.*, 89, 1995, s. 689-690.
6. Bishop, M.R., Jackson, J.D., O'Kane-Murphy, B. et al.: Phase I trial of recombinant fusion protein PIXY 321 for mobilization of peripheral-blood cells. *J. Clin. Oncol.*, 14, 1996, s. 2521-2526.
7. Byrne, J.L., Haynes, A.P., Russel, N.H.: Use of haematopoietic growth factors: commentary on the ASCO/ECOG guidelines. *Blood Reviews* 11, 1997, s. 16-27.
8. Cetkovský, P., Koza, V., Jindra, P. et al.: Individual criteria could be optimal for starting G-CSF application after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 20, 1997, s. 639-641.
9. Declava, E., Cramer, R., Zabucchi, L.J.: Glycosylation improves the priming effect exerted by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) on human neutrophil superoxide production. *International J Tissue Reactions*, 17, 1995, s. 191-198.
10. Demirer, T., Buckner, C., Bensinger, W.: Optimization of peripheral blood stem-cell mobilization. *Stem Cells*, 14, 1996, s. 106-116.
11. Demirer, T., Buckner, C.D., Gooley, T., et al.: Factors influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.*, 17, 1997, s. 937-941.
12. Gheilmini, M., Pettengell, R., Coutinho, L.H. et al.: The effect of the GM-CSF/IL-3 fusion protein PIXY 321 on bone marrow and circulating haematopoietic cells of previously untreated patients with cancer. *Br. J. Haematol.*, 93, 1996, s. 6-12.
13. Glaspy, J.A., Shpall, E.J., LeMaistre, C.F. et al.: Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood*, 90, 1997, s.2939 - 2951.
14. Haas, R., Mohle, R., Fruhauf, S. et al.: Patients characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood*, 83, 1994, strana 3787-94.
15. Haynes, A., Hunter, A., McQuaker, G. et al.: Engraftment characteristics of peripheral-blood stem-cells mobilized with cyclophosphamide and the delayed addition of G-CSF. *Bone Marrow Transplant.*, 16, 1996, s. 359-363.

16. Hohaus, S., Goldschmidt, H., Ehrhardt, R. et al.: Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF. *Exp. Hematol.*, 21, 1993, s. 508-514.
17. Hoglund, M., Bengtsson, M., Cour-Chabernaud, V. et al.: Glycosylated rHuG-CSF is more potent than non-glycosylated rHuG-CSF in mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in healthy volunteers. *Blood*, 86, 1995, 464a.
18. Hoglund, M., Smedmyr, B., Bengtsson, M. et al.: Mobilization of CD34+ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy volunteers - a comparative study. *Eur. J. Haematol.*, 59, 1997, s. 177-183.
19. Jindra, P., Koza, V., Cetkovský, P. et al.: Cyclophosphamide 3g/m2 and G-CSF is an effective and safe outpatient-based PBSC mobilising regimen: a single centre experience (Letter). *Bone Marrow Transplant.*, 20, 1997, s. - 91-93.
20. Jones, H.M., Jones, S.A., Watts, M.J. et al.: Development of a simplified single-apheresis approach for peripheral-blood progenitor-cell transplantation in previously treated patients with lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 12, 1994, 1693-1720.
21. Klener, P. a kolektiv. *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Grada Publishing, 1997, 264 stran.
22. Kolbe, K., Peschel, C., Rupilius, B. et al.: Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization with chemotherapy followed by sequential IL-3 and G-CSF administration in extensively pretreated patients. *Bone Marrow Transplant.*, 20, 1997, s. 1027-1032.
23. Kulkarni, S., Powles, R., Treleaven, J. et al.: Comparison of equal doses of lenograstim and filgrastim for mobilization of peripheral blood stem cells in patients with haematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant.*, 21, S1, 1998, S11 (Abstract No.680).
24. Mavroudis, D., Read, E., Cottlerfox, M. et al.: CD34(+) cell dose predict survival, post-transplant morbidity and rate of haematological recovery after marrow transplants for haematological malignancies. *Blood*, 88, 1996, s. 3223-3229.
25. Mayer, J., Kořístek, J., Vorlíček, J. et al.: Ifosfamide and etoposide based chemotherapy as salvage and peripheral blood progenitor cells mobilizing regimens for poor prognosis lymphoma. *Bone Marrow Transplant.*, 17 S1, 1997, S 193 (Abstract No P769).
26. Mayer, J., Doubek, M., Klabusay, M.: CD 34+ buňky: jejich klinický význam a detekce pomocí průtokové cytometrie. *Klin. Onkologie, Suppl.* 08/1998, s. 24-28.
27. McQuaker, G., Haynes, A.P., Stainer, C. et al.: Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma - superior yield of progenitor cells following a salvage regimen comprising ifosfamide, etoposide and epirubicin compared to intermediate dose cyclophosphamide. *Br. J. Haematol.*, 98, 1997, s. 228-233.
28. Ratajczak, M.Z., Ratajczak, J., Machalinski, B. et al.: In vitro and in vivo evidence that ex vivo cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate posttransplant thrombocytopenia. *Blood*, 91, 1998, s. 353-359.
29. Saccardi, R., Avanzi, G., Benzini, R. et al.: Mobilization of PBPC for hematological rescue: comparison between glycosylated and non-glycosylated G-CSF. *Bone Marrow Transplant.*, 19, S1, 1997, S11 (Abstract No.043).
30. Sutherland, D.R.: Assessment of peripheral blood stem cell grafts by CD 34+ cell enumeration: Toward a standardized flow cytometric approach. *J. Hematother.* 5, 1996, s. 209-210.
31. Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M. et al.: The ISHAGE guidelines for CD 34+ determination by flow cytometry. *J. Hematother.* 5, 1996, s. 213-226.
32. Van Os, R., Robinson, S., Sheridan, T., et al.: Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone marrow stem cell damage caused by repeated administration of cytotoxic agents. *Blood*, 92, 1998, s. 1950-1956.
33. Watts, M.J., Addison, S.G., Long, S. et al.: Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non-glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *Br. J. Haematol.*, 98, 1997, s. 474-479.
34. Weaver, A., Chang, J., de Wynter, E. et al.: Randomized comparison of progenitor-cell mobilization using chemotherapy, stem-cell factor, and filgrastim or chemotherapy plus filgrastim alone in patients with ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, s. 2601-2612.
35. Weaver, C.H., Hazelton, B., Birch, R. et al.: An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD 34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*, 86, 1995, s. 3961-3969.
36. Weaver, C.H., Birch, R., Greco, F.A., et al.: Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: A randomized dose escalation trial of filgrastim. *Br. J. Haematol.*, 100, 1997, s. 338-347.
37. Weaver, C.H., Tauer, K., Zhen, B., et al.: Second attempts at mobilization of peripheral blood stem cells in patients with initial low CD34+ cell yields. *J. Hematotherapy*, 7, 1998, s. 241-249.
38. Williams, S.F., Lee, W.J., Bender, J.G. et al.: Selection and expansion of peripheral blood CD 34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood*, 87, 1996, s. 1687-1691.
39. Winter, J.N., Lazarus, H., Rademaker, A.: Phase I/II study of combined granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage stimulating factor administration for the mobilization of hematopoietic progenitor cells. *J. Clin. Oncol.*, 14, 1996, s. 277-286.

informace

OTEVŘENÝ DOPIS VŠEM ČLENŮM ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

Vážené kolegyně, vážení kolegové, výbor ČOS se na Vás obrací s následující prosbou. Mnozí z Vás se nepochybně ve své praxi setkali s případy nemocných, kteří se do Vaší péče dostali ve stadiu značně pokročilého onemocnění proto, že se po stanovení diagnózy podrobili léčbě různými neprověřenými a neúčinnými metodami. Zejména přibývá případů léčených Iscadorem nebo Irisapem (ačkoliv ani jeden z těchto přípravků není v ČR registrován a jeho podávání je proto nelegální). Tuto léčbu bohužel v některých případech doporučují i lékaři. Protože chceme dalšímu poškozo-

vání onkologických nemocných zabránit, žádáme Vás, pokud jste se ve své onkologické praxi s podobným případem setkali, abyste nám poskytli přesnější informaci, tj. jméno lékaře a zdravotnického zařízení, které tuto léčbu indikovalo, iniciály, rok narození a diagnózu nemocného, trvání zbytečné prodlevy od nasazení alternativní léčby do zahájení konvenční léčby. Zároveň Vás žádáme, abyste připravili dokumentaci o takto poškozeném pacientovi pro šetření Revizní a etické komise České lékařské komory. Zprávu zašlete co nejdříve na adresu vědeckého sekretáře (doc. L. Petruželka, Onkologická klinika VFN, 128 08 Praha 2, U nemocnice 2).

Děkujeme Vám za vstřícnost a spolupráci

Jméno výboru ČOS, prof. MUDr. P. Klener, DrSc., v. r.