

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Diplomová práce

Praha 2008

Bc. Jan Mecl

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

I. interní klinika 1.LF-UK a VFN

Výsledky vysokodávkované chemoterapie s podporou periferních kmenových buněk u pacientů s mnohočetným myelomem – zkušenosti centra. Srovnání jednotlivých léčebných postupů.

Diplomová práce

Praha 2008

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. MUDr. Ivan Špička

Vypracoval:

Bc. Jan Mecl

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a použil jsem jen prameny uvedené v seznamu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena na Karlově univerzitě v Praze v knihovně 1. Lékařské fakulty a zpřístupněna ke studijním účelům.

.....

podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. MUDr. Ivanu Špičkovi, za odborné vedení této práce, za velké množství cenných rad a podnětů, a také za kritické připomínky a opravy, které měl v průběhu vzniku této práce.

Děkuji také biochemické laboratoři ÚHKT za praktickou ukázkou separace kmenových buněk PBSC.

Děkuji pracovníkům této laboratoře jmenovitě prim. MUDr Haně Gašové za poskytnuté materiály, ochotu a čas, který mi věnovala pro vysvětlení PBSCT.

Děkuji René Zounarovi, zaměstnanci hematologické laboratoře za čas, který se mnou strávil při vyhledávání údajů o hematologických nemocných a za pomoc při úpravě práce.

Děkuji Bc. Miroslavu Kuchtovi za pomoc při grafické úpravě textu.

A v neposlední řadě děkuji RNDr Miroslavu Procházkovi, pracovníkovi Státního Zdravotního Ústavu za pomoc při statistickém zpracování výsledků separací kmenových buněk a transplantací.

Údaje o průběhu obhajoby bakalářské práce

Obhajoba konána dne 18.9. 2008

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Ivan Špička

Oponent: MUDr. Jan Kořen,

Přisedící:

Hodnocení:

Abstrakt

Výsledky vysokodávkované chemoterapie s podporou periferních kmenových buněk u pacientů s mnohočetným myelomem – zkušenosti centra. Srovnání jednotlivých léčebných postupů.

Jan Mecl

(Univerzita Karlova, 1.Lékařská fakulta, Zdravotnická technika a informatika,
5.ročník)

1.interní klinika 1.LF - UK a VFN

Při terapii MM se využívá separace kmenových buněk nemocného, a jejich následný převod po vysokodávkované chemoterapii, tzv. autotransplantace (ASCT – Autologous Stem Cell Transplantation). Ke zmnožení periferních kmenových buněk před jejich separací slouží mobilizace resp. stimulace podáním cytostatik, jako cyklofosfamid (CFA) nebo jejich kombinací (např. režim IVE - ifosfamid, vepesid, epirubicin) spolu s růstovým faktorem G – CSF (granulocyte – colony - stimulating factor). ASCT může být jednoduchá nebo opakovaná, podle výsledného efektu, resp. standardních protokolů používaných v různých centrech.

Mým úkolem je porovnat různé typy separací kmenových buněk z hlediska úspěšnosti zmnožení kmenových buněk a z hlediska časové náročnosti separací. Jinými slovy porovnat reakce pacientů na mobilizaci a na následnou autotransplantaci kmenových buněk.

K separaci kmenových buněk byl použit separátor COBE Spectra schopný separovat plnou krev na její jednotlivé komponenty. K autotransplantaci byla použita standardní metoda. Pracovní skupinou bylo 167 nemocných s mnohočetným myelomem, u kterých jsem porovnával jak typ a délku jednotlivých separací a výtěžek CD 34+ buněk (jednoho z hlavních typů

kmenových buněk), tak výsledky terapie jednoduché autotransplantace 1ASCT a opakované 2ASCT.

Práce prokázala, že mobilizace pomocí kombinace IVE se jeví jako výhodnější pro sběr CD34+ buněk než samotný CFA. Výtěžek CD34+ buněk u IVE mobilizovaných pacientů je vyšší než u nemocných mobilizovaných CFA. Tito pacienti zároveň stráví separační procedurou přibližně o dvě hodiny méně. Dále práce prokázala, že mezi jednoduchou a opakovanou transplantací u pacientů s mnohočetným myelomem není signifikantní rozdíl

Abstract

The results of high dose therapy with periferal blood stemm cells (PBSCs) support in patients with multiple myeloma – experience of the center – comparison of several therapeutical procedures.

The submitted thesis is based on comparison of therapeutical effectivity of two different methods using in multiple myeloma patients for therapy. The best therapy seems to be single or tandem autologous stem cell transplantation ASCT with stimulation and separation of periferal blood stem cells (PBSCs). The stimulation could be done by CFA (cyclofosfamid) or cytostatik combination, e.g. IVE (ifosfamide, vepeside, epirubicine) in combination with G – CSF (granulocyte – colony - stimulating factor). The question which is not answered is which one of those methods is more effective. And which one of single or tandem ASCT is more profitable if any.

The goal of the study is to compare two different methods of stimulation and separation of PBSCs (CFA and IVE). I compare the effectivity from a viewpoint of breeding PBSCs and also time consuming of the separation methods. Nobody has done this comparison before us. To separate PBSCs was used COBE Spectra apheresis systém. Spectra is efficient to separate the whole blood into its components.

The group for my study were 167 patients with Multiple Myeloma. Part was stimulated with CFA the other part with IVE. In every one of those groups we compare the number of PBSCs represent by CD34+ cells, type and period of several separation methods and also differences between single and tandem ASCT.

Our study demonstrate that mobilization with IVE seems to be more effective for PBSCs breeding then CFA. The yield of CD34+ cells is higher and also the time for IVE separation procedure is shorter. We also demonstrate that there is no significant differencies between single and tandem transplantation.

Obsah

1. ÚVOD

1.1. Co je mnohočetný myelom

1.2. Léčba MM

1.3. ASCT vysokodávková terapie s transplantací PBSC

1.4. Separace periferních kmenových buněk PBSC

2. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

2.1. Soubor pacientů

2.2. Metodika

2.3. Vývoj aferézního systému COBE Spektra

2.3. Technické aspekty systému COBE Spektra

3. VÝSLEDKY

3.1. Výsledky separace PBSC

3.2. Výsledky transplantace periferních kmenových buněk celkem

**3.3. Výsledky ASCT z hlediska celkového přežití, korelace
jednoduché a opakované transplantace**

4. DISKUZE

5. ZÁVĚR

SEZNAM LITERATURY

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem mé práce je porovnat 2 různé typy separací kmenových buněk z hlediska úspěšnosti zmnožení kmenových buněk a z hlediska časové náročnosti separací u pacientů s mnohočetným myelomem. Před separační procedurou se používá k mobilizaci periferních kmenových buněk pacientů dva typy cytostatik. Za prvé je to CFA (Cyklofosfamid) a za druhé kombinované IVE (Ifosfamid, vepesid, iperubicin). Výsledek by měl ukázat na efektivnější látku z těchto dvou. Dále mám k dispozici reakce pacientů na následnou jednoduchou nebo opakovanou transplantaci periferních kmenových buněk. Vedlejším přínosem bude porovnání reakce pacientů na následnou autotransplantaci kmenových buněk.

Výsledky vysokodávkované chemoterapie s podporou periferních kmenových buněk u pacientů s mnohočetným myelomem – zkušenosti centra. Srovnání jednotlivých léčebných postupů.

1. ÚVOD

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na srovnání účinnosti terapie mnohočetného myelomu. Mnohočetný Myelom představuje stále nebezpečnou a nevyléčitelnou chorobu. Zatím nejúčinnější léčbou se zdá být vysokodávková terapie s autologní transplantací křevetvorných buněk (ASCT – autologous stem cell transplantation). Té předchází stimulace a následná separace periferních kmenových buněk. Otázka která není spolehlivě zodpovězena je, která látka je výhodnější pro stimulaci PBSCs a zda opakovaná transplantace je lepší než transplantace jednoduchá. Stejně tak nejsou utříděné poznatky o separaci a stimulaci kmenových buněk nemocných. Tyto a další důvody mě vedly k výběru tohoto tématu. Ve své práci se pokusím tyto aspekty vyhodnotit a na základě výsledků předložit efektivní způsob léčby pro nemocné s mnohočetným myelomem.

V kapitole metodika je práce zaměřená na vysvětlení a popis technických aspektů jak samotného přístroje pro separaci kmenových buněk periferní krve, tak na způsob separace a následnou transplantaci těchto buněk.

Důležitým zdrojem je pro mne moje bakalářská práce, kde jsem se zabýval metodami diagnostiky mnohočetného myelomu. Porovnával jsem standardní imunochemické metody, (ELFO a I-elfo) s novou metodou stanovení volných lehkých řetězců v séru.

V současné studii pozorujeme 175 nemocných s mnohočetným myelomem z hlediska efektivnosti různých druhů terapie. U každého nemocného hodnotíme délku a druh separace kmenových buněk a počet odebraných CD34+ buněk. Dále pak efekt resp. odpověď na jednoduchou nebo opakovanou autologní transplantaci kmenových buněk ASCT.

1. 1. Co je mnohočetný myelom (MM)

Mnohočetný myelom (MM) je po nehodgkinských lymfomech druhou nejčastější, ve většině případů stále nevyléčitelnou hematologickou malignitou. Představuje 1% nádorových onemocnění celkově a vede ke 20ti% úmrtí pacientů s hemato-onkologickými chorobami. Toto onemocnění je charakterizované proliferací klonálních plazmatických buněk (tj. nejzralejší vývojové fáze B lymfocytů produkující imunoglobuliny) a jejich akumulací v kostní dřeni.¹

Zřejmě prvním popisem myelomu je případ Sarah Newburyové, u které pitva v roce 1844 prokázala gelatinozní hmotu v kostech tvořenou oválnými buňkami s jasným centrálně uloženým jádrem. Mnohem známější je však zpráva o nemoci londýnského obchodníka T.A. McBeana z roku 1945, u něhož William Macintyre a následně konzultovaný patolog Henry Bence-Jones (viz. obr.) našli v moči bílkovinu se specifickými vlastnostmi. Termín mnohočetný myelom použil v roce 1873 von Rustizky, který popsal i typický vzhled myelomových buněk.



¹ Petruželka L., Konopásek B., Klinická onkologie, Praha Karolinum 2003, s. 168 – 171.

Třemi základními projevy mnohočetného myelomu jsou:

- infiltrace kostní dřeně nádorovou populací produkce monoklonálního imunoglobulinu (M- proteinu, paraproteinu) typu IgG, IgA, lehkých imunoglobulinových řetězců kappa a lambda, ojediněle typu IgE, IgD a IgM.
- kostní postižení a z toho vyplývající i nejčastější manifestace choroby – algický syndrom při osteolýze.

Dalšími projevy nemoci jsou imunodeficit, anémie, renální postižení (snížení renální funkce nebo proteinurie), hyperkalcémie event. tvorba amyloidu.

Diagnostický postup je založený na průkazu výše uvedených hlavních projevů nemoci. Zahrnuje histologické vyšetření kostní dřeně a biochemické laboratorní testy. Součástí průkazu monoklonálního proteinu musí být i vyšetření moči. Při tvorbě paraproteinu (pp) z lehkých řetězců může být hladina v séru nižší než je citlivost běžně používaných metod. Průkaz paraproteinurie také ukazuje na možnost současné nebo hrozící Bence – Jonesovy neuropatie. Z dalších vyšetření je to RTG, CT a NMR kostí.²

V diferenciální diagnostice je nutno vyloučit některé další choroby provázené tvorbou paraproteinu. Odlišení iniciální fáze MM proti MGUS („monoclonal gammopathy of undetermined significance“, monoklonální gamapatie nejasného významu) resp. SMM („smoldering myeloma“, „doutnající myelom“) je někdy i přes relativně přesně stanovená kritéria obtížné a k závěru vede až opakované posouzení laboratorních parametrů v časovém odstupu. Dosud také není k dispozici žádná metoda, která by v případě MGUS (SMM) jednoznačně předpověděla progresi v maligní (resp. generalizované) onemocnění, a proto i zde je rozhodující klinické a laboratorní sledování.

Mnohočetný myelom má přes dobrou terapeutickou odpověď v úvodních fázích většinou progresivní průběh, dosud udávaný medián přežití je asi 3 roky. Zhruba 25 % pacientů léčených tzv. konvenční terapií přežívá 5 let, méně než 5 % pak 10 let³

² Špička I., Klener P., Mnohočetný myelom – klinické projevy, diagnostika, prognóza, léčba, I. Interní klinika LF UK a VFN, Praha, s. 1.

³ Špička I., Klener P., Mnohočetný myelom – klinické projevy, diagnostika, prognóza, léčba, I. Interní klinika LF UK a VFN, Praha, s.2.

V současnosti je nejrozšířenějším prognostickým kritériem klinické stadium choroby podle Durie Salomona, která řadí mnohočetný myelom do třech stádií podle hladin paraproteínu (pp), lehkých řetězců (LC) v moči, hladiny vápníku (Ca 2+) a hemoglobinu (Hb) v krvi (viz. tab. č. 1).

Tab. č. 1⁴

klinické stádium		I	II	III
hladina pp (M – komponenty) dle ELFO	IgG	<50 g/l	50 – 70 g/l	>70 g/l
	IgA	<30g/l	30 – 50g/l	>50g/l
lehké řetězce v moči		<4g/24h	4 – 12g/24h	>12g/24h
hladina Ca 2+		<3mmol/l	<3mmol/l	>3mmol/l
hemoglobin (Hb)		>10g/l	8,5 – 10g/l	<8.5g/l

K těmto stádiím patří subklasifikace „A“ nebo „B“, kterou určuje hladina kreatininu. Hladina vyšší než 177 mmol/l (v originální analýze 2 mg/l) ukazuje na závažnější stadium provázené renálním postižením (viz. tab. č. 2)

Tab. č. 2

subklasifikace	A	B
Kreatinin (mikromol/l)	<177	>177

⁴ Durie B.G.M., Salmon S.E.: A clinical staging system for multiple myeloma. Cancer, 36, 1975, s. 842-854.

U pacientů s MGUS a SMM terapii nezahajujeme. Indikací k léčbě je vzestup pp, rozvoj komplikací (osteolýza, renální insuficience z důvodů Bence – Jonesovy neuropatie, anémie, extramedulární tumor) a zřejmě přítomnost některých negativních prognostických faktorů.⁵

Ve většině případů dochází k relapsu choroby s postupnou necitlivostí na terapii, nejčastější příčinou smrti je progresse onemocnění, infekční a krvácivé stavy. Při rozvoji řady komplikací v počátku, průběhu i konečných fázích nemoci hraje ústřední úlohu paraprotein.

1.2. Léčba MM

Základem protinádorové léčby u mnohočetného myelomu je kombinace cytostatik a kortikosteroidů, roste úloha imunoterapie, uplatňuje se i radioterapie a chirurgická léčba. U pacientů v počátečním stadiu mnohočetného myelomu onemocnění nejeví tendenci k progresi, v těchto případech a u starších pacientů se podání chemoterapie nedoporučuje.⁶

Indikací k léčbě je vzestup hladiny Mlg, rozvoj komplikací, osteolýza, renální insuficience, anémie a přítomnost negativních prognostických faktorů. Mezi dříve uváděné patří hodnoty Hb < 120, hladina monoklonálního proteinu IgG > 30g/l, IgA > 25 g/l a počet plazmatických buněk v kostní dřeni > 25 % .Pokud je indikováno zahájení chemoterapie, její povaha v současnosti závisí na věku, resp. celkovém stavu nemocného.⁷

Při monitorování aktivity choroby a hodnocení terapeutické odpovědi vycházíme z parametrů, které odrážejí hlavní projevy myelomu. Nejjednodušší a relativně přesné je většinou stanovení hladiny M proteinu pomocí elektroforézy. Provádíme je (spolu se základním biochemickým vyšetřením) v závislosti na stavu pacienta, fázi choroby a délce trvání remise po jednom později po

⁵ Špička I., Klener P., c. d. s.3

⁶ Špička I, Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, Praha Galén 2005, s.74 – 76

⁷ Špička I, Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, Praha Galén, s.73

dvou měsících. RTG vyšetření skeletu provádíme při diagnóze, po ukončení léčby a dále jedenkrát ročně.⁸

V současné době se používá několik typů hodnocení léčebné odpovědi. V případě konvenční terapie jsou nejčastěji používána kritéria navržená skupinou CLMTF (Chronic Leukemia and Myeloma Task Force) v roce 1968 a 1973, ve které se hodnotí odpověď na léčbu podle kolísání hladin monoklonálního proteinu v séru o 50% (vzestup či pokles).

V našem hodnocení výsledků vysokodávkované terapie používáme jednotná kritéria stanovená v roce 1998, vypracovaná zástupci hlavních transplantačních skupin (EBMT, IBMTR, ABMTR) a odborníků zabývajících se mnohočetným myelomem. (viz tabulka str 72). Podle charakteru a závažnosti onemocnění indikujeme v podstatě dva typy léčby popsané níže.⁹

Konvenční léčba je indikována pouze u pacientů, u nichž nelze (z důvodu věku či současných závažných onemocnění) použít transplantační metody. Základem je kombinace alkylačních látek a kortikosteroidů, v laboratorních podmínkách byl prokázán jejich antiproliferativní efekt na myelinové buňky.¹⁰Podrobnou farmakoterapii zde nebudu popisovat, je popsaná v knize Mnohočetný Myelom od autora I. Špičky a kol.

FACON, T., MENARD, JF., MICHAUX, JL., et al. Prognostics factors tumour mass asymptomatic myeloma. Am J Hematol, 1995, 48, p. 71 – 75.

⁹ Blade J., et al. Kriteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high dosetherapy and haemopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol, 1998, 102, s.1115 – 1123

¹⁰ Ščudla, V. Pokroky v léčbě mnohočetného myelomu. Vnitř. Lék, 1997, 8, s. 529 – 536

1.3. Vysokodávková terapie s autologní transplantací kmenových buněk ASCT (Autologous Stem Cell Transplantation)

Vysokodávkovaná terapie s autologní transplantací krevetvorných buněk je považována v současnosti za standardní léčbu nemocných s mnohočetným myelomem do 65 let věku, které mají klinické stadium II nebo III. Využívá se nečištěných periferních progenitorových buněk PBPC, které se sbírají po předchozí mobilizaci chemoterapií. Jako mobilizační režim se nejčastěji používá kombinace chemoterapie CFA (cyklofosamid) event kombinovaná chemoterapie IVE (Ifosamid Vepesid epirubicin) a podávání G – CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor). Porovnání vlivu těchto dvou mobilizačních režimů CFA a IVE na počet periferních kmenových buněk je jedním z úkolů naší práce. Zdá se, že opakovaná transplantace má lepší výsledky než jednoduchá, podle současných názorů však jen v některých skupinách pacientů. Přes zlepšení výsledků celkového přežití, obzvláště ve skupině nemocných bez rizikových faktorů nelze považovat transplantaci za kurativní výkon a ukazuje se nutná kombinace zejména s imunoterapií (představovanou autologní transplantací a adoptivní imunoterapií) nebo s novou generací protinádorových léků.¹¹

1.4. Separace periferních kmenových buněk

Krvetvorné buňky nejsou přítomné pouze ve dřeni, ale také v periferním krevním oběhu. Tyto periferní kmenové buňky (PBSCs – Periferal Blood Stem Cells) mohou být separovány z periferní krve pomocí aferézního systému Spektra. Za normálních okolností je počet cirkulujících PBSCs v periferní krvi velmi malý, mnohem menší než v kostní dřeni. Při potlačení funkce kostní dřene chorobou samotnou nebo chemoterapií a imunopresí počet PBSC vzrůstá, je možno je separovat, zmrazit a použít pro následnou autologní transplantaci kmenových buněk ASCT (Autologous Stem Cell Transplantation.)¹²

¹¹ Špička I, Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, Praha Galén, s.78-79

¹² Petengel R., Morgenstern G., Wolp J., Periferal Blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukaemia using a single apheresis, Blood, Volume 82 s.3770 - 3777

Pro ještě větší nárůst hladiny PBSCs v oběhu se začal používat růstový faktor G – CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Faktor). Je to v podstatě stimulant nebo mobilizér, který působí efektivně na zmnožení progenitorových buněk kostní dřeně a jejich vyplavení do periferní krve. Výsledky studií zabývajících se G – CSF ukazují na procentuální nárůst CD 34 + buněk z 0,05 % před léčbou na 1,5% po pěti dnech mobilizace. Z jedné separace (aferézní procedury) tak lze získat $4,5 \times 10^6$ CD 34+ buněk. Běžná dávka CD34+ buněk vhodná pro transplantaci je cca $2-3 \times 10^6$ pro 70 kg osobu, což je něco kolem $2,5 - 5 \times 10^6$ /kg. Tudíž výtěžek již z jedné mobilizace a následné separace může být vhodný pro autologní transplantaci kmenových buněk.¹³

¹³ Stroncek D.E, Clay M.E., Smith J., Composition of peripheral blood progenitor cell components collected from healthy donors, Transfusion 1997, Volume 82 s.3770-3777

2. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

2.1. Soubor pacientů

Ve své studii jsem pozoroval hodnoty u 175 pacientů s mnohočetným myelomem ve věku 34 – 75 let. Údaje o nemocných jsem získal z informační databáze myelomové skupiny I. interní kliniky VFN (klinická data jsou uvedena v příloze.) V souboru nemocných jsou 95 muži a 80 ženy. Z hlediska pokročilosti choroby bylo 118 nemocných v klinickém stadiu III, 50 ve stadiu II a 7 v počátečním stadiu I. Dle subklasifikace, která při hladině kreatininu nad 177 mmol/l ukazuje na závažnější stadium B provázené renálním postižením, je z celé skupiny 34 nemocných v tomto stadiu, ve stadiu A potom 142.

Pro zřehlednění jsem nemocné podle stadia nemoci rozdělil do tabulky č. 3

Tab. č.3

Mnohočetný myelom (MM)				
klinické stádium podle Durie Salmona			subklasifikace	
I	II	III	A	B
7	51	118	142	34

Dále jsem nemocné rozdělil podle typu Mlg (monoklonálního imunoglobulinu) . Nejpočetnější zastoupení má IgG kappa 76 nemocných, následuje IgG lambda 43, IgA kappa 22, IgA lambda 15, LC lambda 10 a LC kappa 8 nemocných. Viz .tab. č.4

Tab. č. 4

Typ paraproteinu – M komponenta					
IgG – L	IgG – K	IgA – L	IgA – K	LC – L	LC – K
43	76	15	22	10	8

Další kritérium stadia nemoci je hodnota ISS („international staging system“, mezinárodní stážovací systém). Vyhledávali jsme proto z biochemických vyšetření hodnoty Alb (albuminu) a B2M (beta2mikroglobulinu) v séru. Vztah hodnot k ISS je popsán v tabulce (tab. 5). Ve stadiu ISS I je 106 nemocných ISS 2 má 39 a ISS 3 – 30 pacientů.

Tab. č. 5

Stadia MM definována podle ISS		
	Hodnoty Albuminu v séru	
Hodnoty B2M séru	>3,5g/dL	<3,5g/dL
<3,5 mg/L	Stadium 1	Stadium 2
3,5mg/L - 5,5mg/L	Stadium 2	Stadium 2
>5,5mg/L	Stadium 3	Stadium 3

2.2. Metody

K separaci kmenových buněk byl použit separátor Spectra Apheresis System COBE(aferézní systém COBE Spektra .) Tento přístroj si bere plnou krev od pacienta resp. dárce, po přidání antikoagulancia pumpuje krev skrze set do centrifugy a separuje krev na její jednotlivé komponenty (manuál COBE). Krevní složky získané od dárců jsou určeny pro transfúze pacientům

2.3. Vývoj a základní principy aferézního systému

Aferézní systém COBE Spektra (COBE spektra apheresis systém) je určen k separaci a odběru krevních složek jak od dárců tak od pacientů. Sběr PBSC se používá s použitím 2 jehel (1 jehla pro odběr 1 jehla pro návrat) nebo jednou jehlou pro odběr i návrat.

Celý systém tvoří soupravy prstence a hadic na jedno použití, které jsou předem propojené (set) a samotný přístroj pro aferézu. Spektra je automatizovaný separátor krevních buněk na bázi odstředivky, který zabezpečuje funkce nutné pro kontrolu a monitorování extrakorporálního oběhu během separačních procedur. Set je v podstatě souprava hadic se separačním prstencem, který se otáčí v odstředivce přístroje aby se krev rozdělila na jednotlivé složky, dále obsahuje hadice, jimiž protéká krev a náhradní roztoky.¹⁴ Ke zdokonalení centrifugačního přístroje do dnešní podoby vedla cesta od poloviny 20 století, tento vývoj stručně popíši v následujícím odstavci.¹⁵

Ve čtyřicátých letech minulého století se s rozvojem haemoterapie a chirurgie začala rozsáhle používat transfúze plazmy a krevních komponent. S vývojem frakcionizace plazmy a krevních elementů bylo nutné přijít na způsob nepřetržitého promývání krve uvnitř bakteriologicky nepropustné uzavřené centrifugy, bez omezení pro objem zpracovávané krve.

Princip prvních transfúzí byl prostý. Pacientovy byl odebrán určitý objem krve, separovaly se požadované krevní elementy, zbytek krve mu byl vrácen. Tento postup se opakoval až do nasbírání potřebného množství krevních komponent. Tato metoda byla časově náročná, těžkopádná a drahá.

První speciální intermitentní centrifugační systém pro separaci vyvinul Edwin Cohn (profesor biochemie na harvardu). Artur D. Little Corporation (ADL) v čele s inženýrem Alanem Lathamem a hematologem Jamesem Tullisem později pracovali na modifikaci tohoto separátoru původně určeného pro čištění a deglycerinizaci zmrzlých červených krvinek. Brzy podle těchto pánů vyšel z firmy Abbott Laboratories Model 10, přístroj s centrifugou pro separaci

¹⁴ COBE Spektra Apheresis Systém Essentials Guide.

¹⁵ McCullough J., Introduction to apheresis donations including history and general principles. In: McLeod B, Price T, Weinstein R, eds. Apheresis: Principles and practice, 2nd edn. Bethesda, MD: AABB Press 2003 29-48

krve. Procedura prováděná tímto přístrojem byla nešikovná, centrifuga byla vyrobena z nerez ocele a obsahovala mnoho částí z nichž každá z nich musela být sterilizována mezi jednotlivými použitími. Příklad nebyl praktický pro rutinní práci a širokou míru použití. Firma Haemonetics brzy přišla na trh s více sofistikovaným instrumentem, Model 30. Centrifugační systém byl vyroben z Lucitu a přizpůsoben samotné centrifuze.

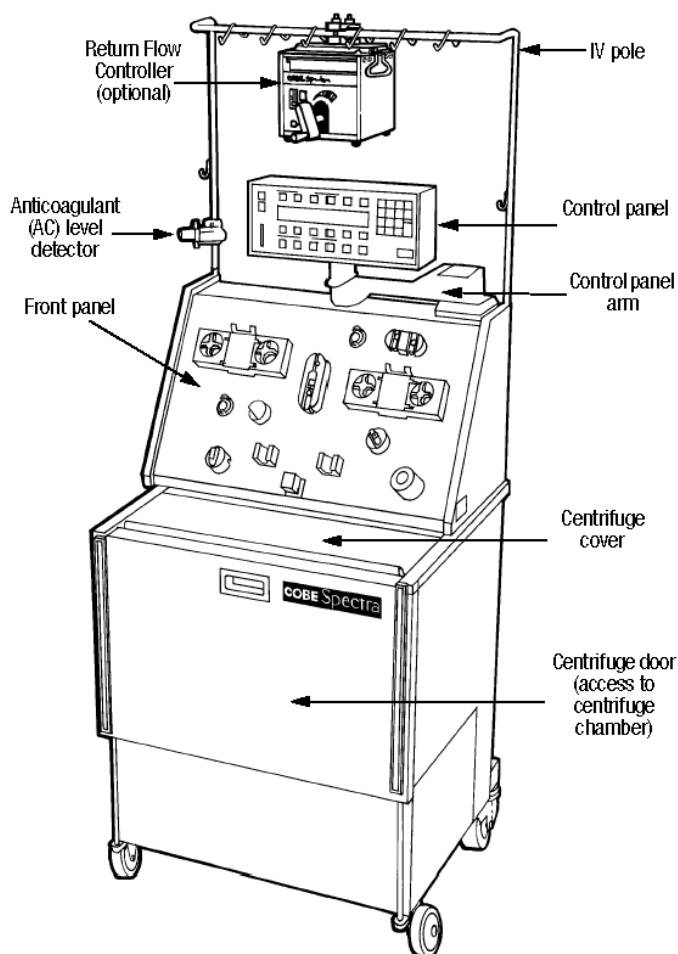
V šedesátých letech se badatelé National Cancer Institute (NCI) spojili s korporací IBM aby vyvinuli zařízení, které by separovalo krevní komponenty krve za nepřerušovaného toku in vivo a vracela plazmu a červené krvinky dárci, takzvaná continuous – flow centrifugation. Ve spolupráci byl osobně zainteresován IBM inženýr, jehož dítě bylo léčeno na NCI leukodeplecí místo chemoterapie. Společným úsilím vyvinuli zařízení pro výkonnější sběr leukocytů. Tak byl vytvořen první kontinuální separátor krevních buněk.¹⁶ Toto zařízení položilo základy k pozdějšímu dokonalejšímu přístroji COBE Spektra, který jsme použili ke sběru periferních kmenových buněk v naší studii. Dále popíši podrobněji tento instrument.

¹⁶ McCullough J., Transfusion Medicine, Elsevier inc. Pennsylvania, 2005 s.131 – 155

2.4. Aferézní systém COBE Spektra

Jak je zmíněno výše, systém Spektra je určen k separaci a odběru krevních složek. Skládá se ze tří složek: předního panelu, kontrolního panelu a centrifugační komory (viz obr. 1).

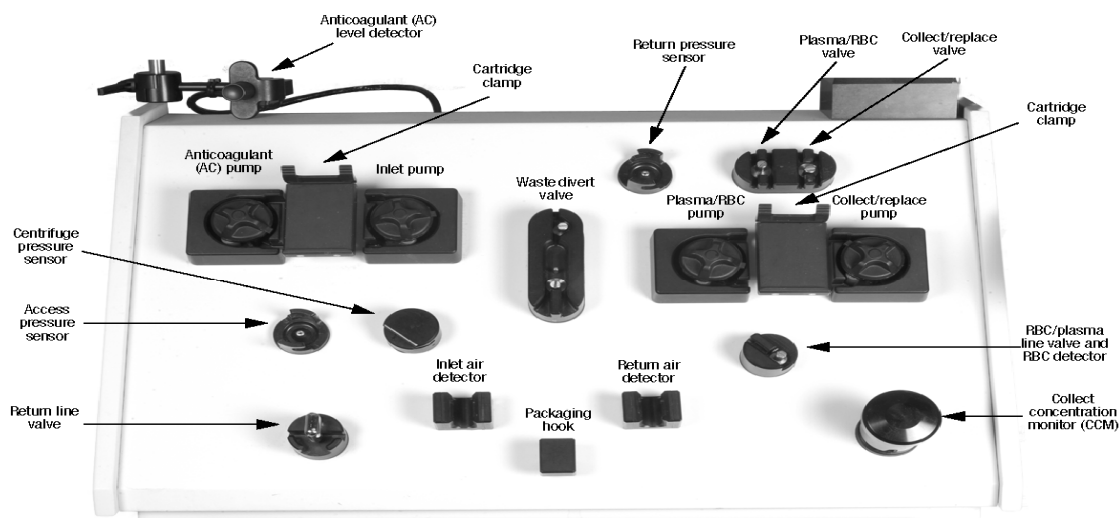
Obr. č. 1



Přední panel umístěný nad centrifugační komorou obsahuje pumpy, zátky a sensory. (obr. 2), které podrobněji popíší níže

Obr. č. 2

Front Panel



front panel

Pumpy: Přístroj má celkem 4 peristaltické pumpy s odnímatelnými rotory pro snadné čištění.

- Antikoagulační pumpa si bere antikoagulant a přivádí ho do vstupního vedení
- Vstupní pumpa pumpuje plnou krev obohacenou antikoagulantem do centrifugy.
- Plazma/RBC pumpa si bere plazmu z centrifugy do sběrného vaku nebo k rekombinaci s krevními komponenty pro návrat pacientovy, podle druhu procedury.

Sběrná pumpa si nasává buňky z centrifugy do sběrného vaku.

Záklopně (chlopně) a sensory : Přístroj má celkem 5 chlopní. Všechny chlopně je v otevřené či zavřené pozici aby umožnili založení nebo naopak vyndání jednorázového setu.

Dále obsahuje spektra systém tři tlakové sensory. Vstupní tlakový sensor, který monitoruje negativní tlak (podtlak) od pacientovy vstupní strany. Tento sensor registruje nízký vstupní tlak.

Centrifugační tlakový sensor, jenž měří tlak za vstupní pumpou. Tento sensor registruje vysoký tlak v centrifuze způsobený vzduchovou bublinou nebo skřípnutím hadice.

Sensor tlaku návratu potom monitoruje pozitivní přetlak nad návratovou vzduchovou komůrkou. Je to hlídač vysokého tlaku v cestě návratu krve pacientovy.

Dále má COBE Spektra systém dva optické detektory, jeden hlídá hustotu krevních elementů ve sběrné hadici a druhý rozpoznává přítomnost červených krvinek v setu a následně otevírá chlopeň pro návrat

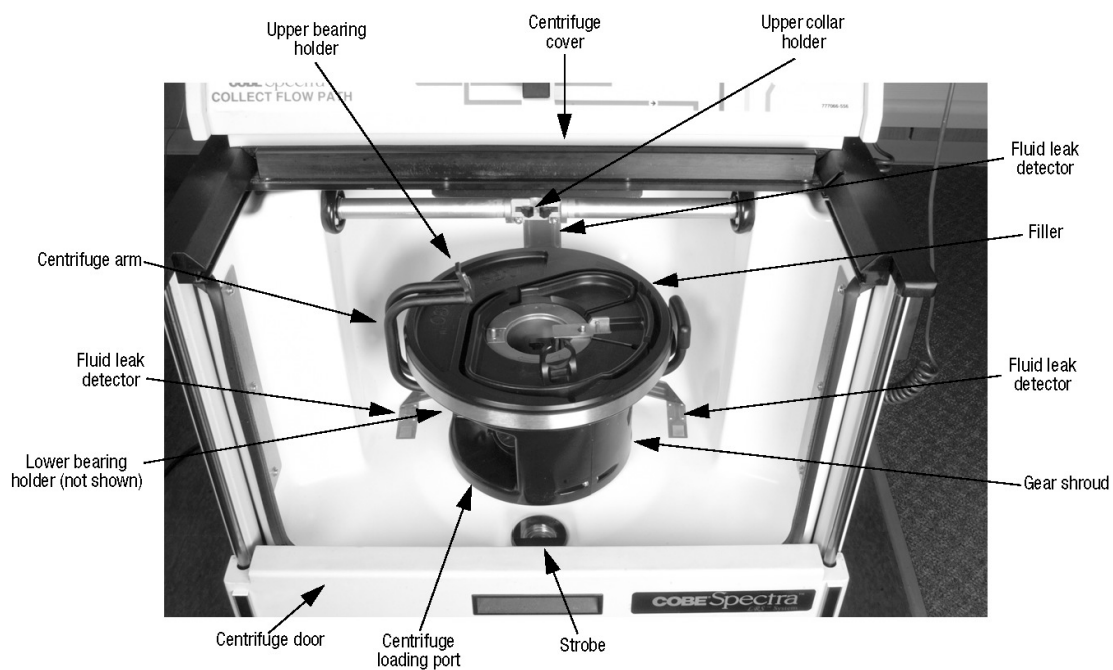
Dále má ultrazvukové detektory vzduchu, vstupní, návratový a registrující vzduch v antikoagulancia.

Kontrolní panel s klávesnicí a funkcí ovládacích prvků indikátory ani alarmy zde nebudu popisovat, jsou k nahlédnutí v uživatelském manuálu.

Za zmínku ještě určitě stojí, že aferézní systém spektra je schopen provádět celkem 14 procedur, podle nastavení přístroje do požadovaného programu. Může to být např. výměna krevní plazmy, sběr červených krvinek jejich výměna, vychytání krevních destiček a další procedury včetně sběru periferních kmenových buněk které byly sbírány a transplantovány pacientům z naší studie.

Při různých druzích procedur hraje klíčovou úlohu centrifugační komora (viz obr. č. 3) se svými čtyřmi odlišnými druhy plničů (fillers, z anglického fill – plnit, (viz obr. č. 4).

Obr. č. 3



Obr. č. 4



System vykonáva každou aferézni proceduru s použitím specifického plniče, ktorý je výmenný a instaluje se do centrifugačnej komory podľa druhu programu.

3. VÝSLEDKY

3.1. Výsledky separace PBSCs

Celkem máme k dispozici údaje o separaci u 159 nemocných. U každého z nich jsem hodnotil počet dní separací, druh mobilizace CFA nebo IVE a její vliv na výtěžek CD34+ buněk. Výsledky jsem zpracovával statistickou metodou pomocí Wilcoxonova testu.

Z celkového počtu bylo 118 nemocných mobilizovaných častěji používaným cyklofosfamidem CFA a 41 nemocných s kombinací IVE jak je znázorněno v tabulce č. 6

Tab. č. 6

		Case Processing Summary					
		Cases					
		Valid		Missing		Total	
stimul.		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CD34	CFA	118	100,0%	0	0,0%	118	100,0%
	IVE	41	100,0%	0	0,0%	41	100,0%

71 pacientů se separovalo pouze 1 den, 50 nemocných 2 dny, 19 pacientů 3 dny, 13 nemocných 4 dny a 6 potřebovalo 5 dní separace.

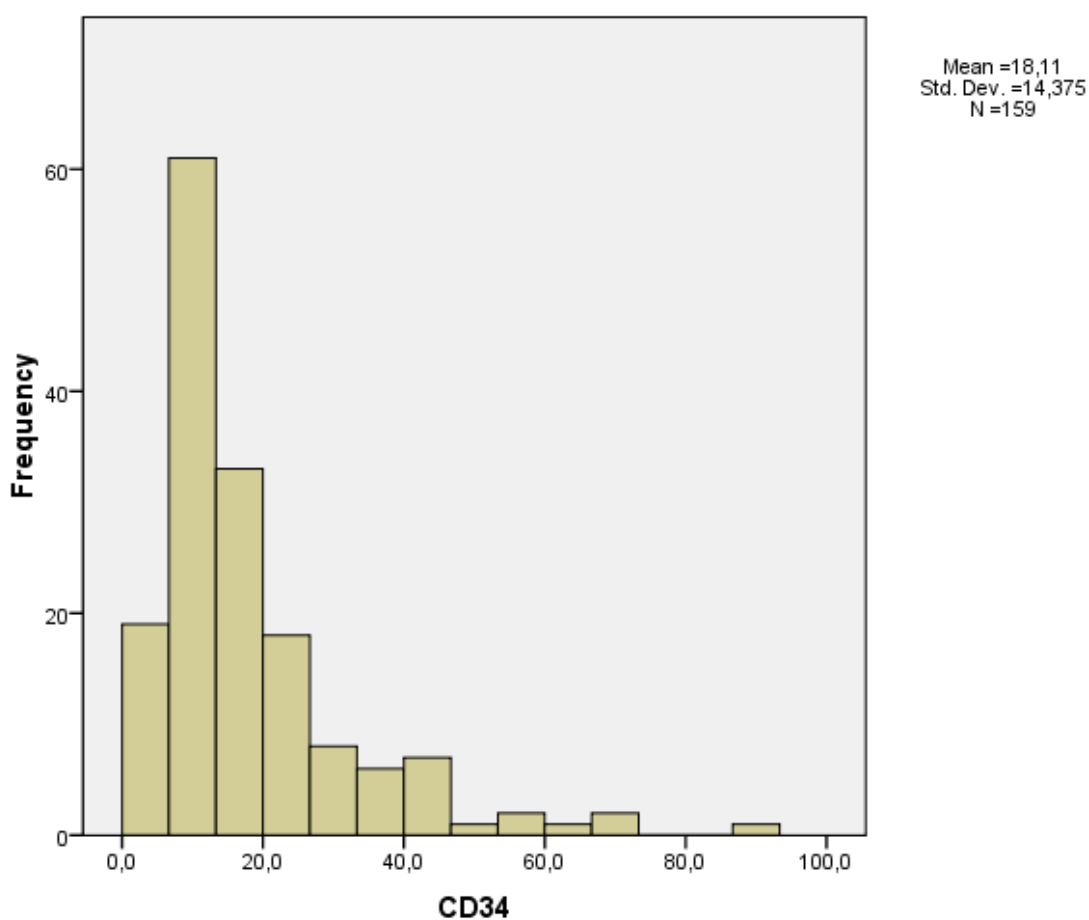
U celé skupiny bylo po stimulaci nasbíráno celkem $2880,01 \times 10^6$ CD34+ buněk. To je v průměru $17,67 \times 10^6$ buněk.

U 118 pacientů stimulovaných CFA bylo separováno v průměru $13,09 \times 10^6$ CD34+ buněk. Medián počtu periferních kmenových buněk byl 11,60. Maximum výtěžku bylo $68,20 \times 10^6$ a minimum činilo $2,20 \times 10^6$ CD34+ buněk. Pacienti mobilizovaní pomocí CFA byli separováni celkově 219 dní, což je v průměru 1,86 dní na osobu.

U 41 nemocných mobilizovaných IVE bylo separováno v průměru $27,62 \times 10^6$ CD34+ buněk. Medián počtu periferních buněk u této skupiny byl potom 26,26. Maximální výtěžek CD34+ buněk byl $93,00 \times 10^6$, minimum bylo $5,40 \times 10^6$.

10⁶. Dále jsem po spočítání došel k výsledku, že u IVE mobilizovaných pacientů se periferní kmenové buňky separovali celkem 67 dní, což činí v průměru 1,63 dní na jednoho pacienta. Tyto a další hodnoty hovořící o signifikantních rozdílech mezi těmito dvěma metodami jsou zaznamenány ve výsledcích Wilcoxonova testu, v tabulkách č. 7, a v grafu č. 1, 2

Graf č. 1

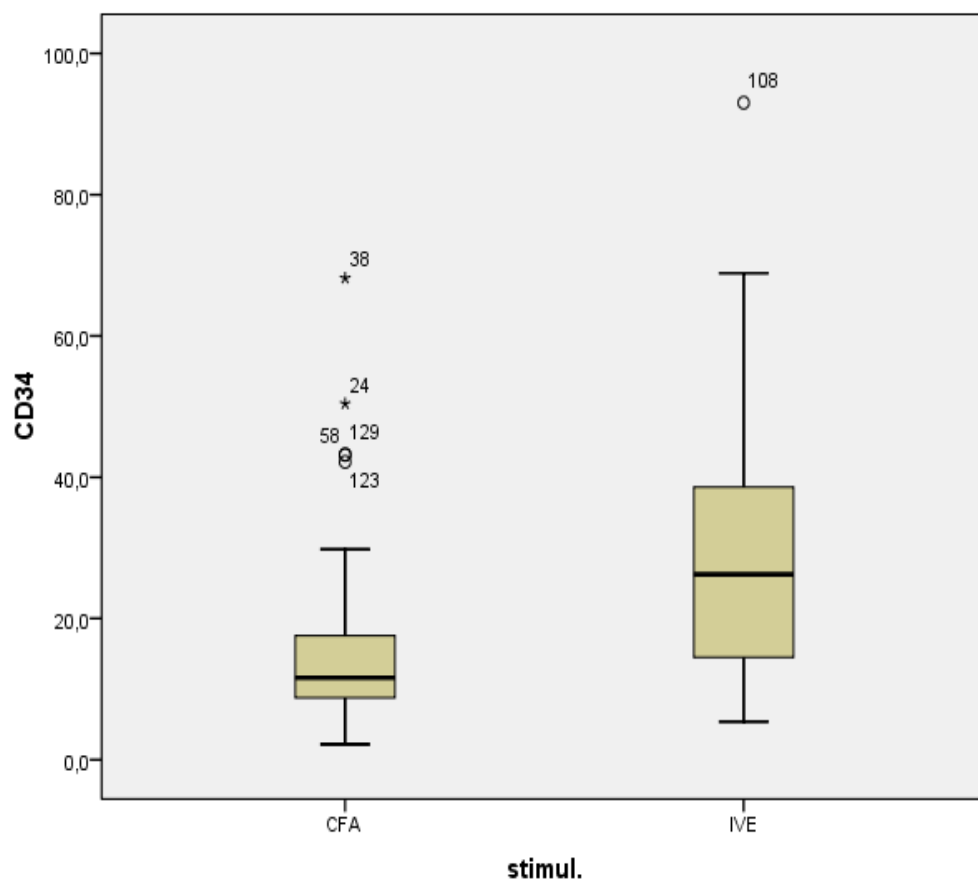


Tab. č. 7

Descriptives^a

stimul.			Statistic	Std. Error	
CD34	CFA	Mean	14,266	,9091	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	12,466	
			Upper Bound	16,067	
		5% Trimmed Mean	13,092		
		Median	11,600		
		Variance	97,514		
		Std. Deviation	9,8749		
		Minimum	2,2		
		Maximum	68,2		
		Range	66,0		
		Interquartile Range	8,9		
		Skewness	2,476	,223	
		Kurtosis	8,894	,442	
		IVE		Mean	29,185
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			23,182	
	Upper Bound			35,188	
5% Trimmed Mean	27,623				
Median	26,260				
Variance	361,718				
Std. Deviation	19,0189				
Minimum	5,4				
Maximum	93,0				
Range	87,7				
Interquartile Range	24,3				
Skewness	1,319			,369	
Kurtosis	2,077			,724	

Graf č. 2



Jak je řečeno výše porovnával jsem tyto dvě skupiny nemocných proti sobě pomocí Welcoxnova testu. Ten prokázal statisticky významný rozdíl ve výtěžnosti periferních kmenových buněk mezi skupinou nemocných stimulovaných CFA a druhou skupinou stimulovaných pomocí IVE. Statisticky se jeví IVE jako výhodnější chemoterapeutikum pro zmnožení CD34+ buněk než CFA. Výtěžek CD34+ buněk u IVE mobilizovaných pacientů je v průměru o 14,53 x 10E6 CD34+ buněk vyšší než u nemocných mobilizovaných CFA. Tito pacienti zároveň stráví separační procedurou v průměru o 0,23 dne méně. Jinými slovy část nemocných stráví na separátoru méně dní. Délka separace má vliv na zatížení pacienta a také je finančně náročná.

3.2. Výsledky transplantace celkem

Sledovali jsme odpovědi nemocných po jednoduché a opakované transplantaci kmenových buněk ASCT.

Jak již bylo řečeno v roce 1998 byla stanovena jednotná kritéria vypracovaná zástupci hlavních transplantačních skupin (EBMT, IBMTR, ABMTR) a odborníků zabývajících se mnohočetným myelomem. Těchto kritérií se držíme při následujícím hodnocení transplantací, výsledky předkládáme v podobě odpovědí na jednoduchou či opakovanou transplantaci. Jednoduchou transplantaci podstoupilo 167 pacientů s mnohočetným myelomem. U 40ti z nich došlo ke kompletní remisi (KR), 22 nemocných dosáhlo velmi dobré parciální remise (VGPR, „very good partial remission“), 96 z nich dosáhlo parciální remise (PR), 8 se dostalo do progresu (PG). U 7 pacientů došlo k nepříhojení štěpu a následné smrti a u 6 zůstalo onemocnění ve fázi tzv. stabilní nemoci (SD). Tyto dvě poslední skupiny nemocných s nepříhojeným štěpem a ve stabilní nemoci jsem do statistiky srovnání jednotlivých typů autotransplantace nezapočítával.

3.3. Výsledky jednoduché transplantace

Pro srovnání celkového přežití pacientů s mnohočetným myelomem jsme použili Kaplan – Meierovu metodu. Nejdříve jsme hodnotili z několika hledisek větší skupinu nemocných po jednoduché transplantaci. První tabulka nám rozdělila nemocné do čtyřech skupin podle odpovědi na léčbu. Viz tab č. 8

Tab. č. 8

odp.	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
KR	40	19	21	52,5%
PG	8	8	0	0,0%
PR	96	43	53	55,2%
VGPR	23	8	15	65,2%
Overall	167	78	89	53,3%

Pro jednoduchost nechám tabulky v původní podobě a popíši názvy sloupců v textu. Total N je počet osob ve skupině. N of Events znamená počet událostí, např. smrtí. Censored je počet nemocných kolik jich bylo bez událostí.

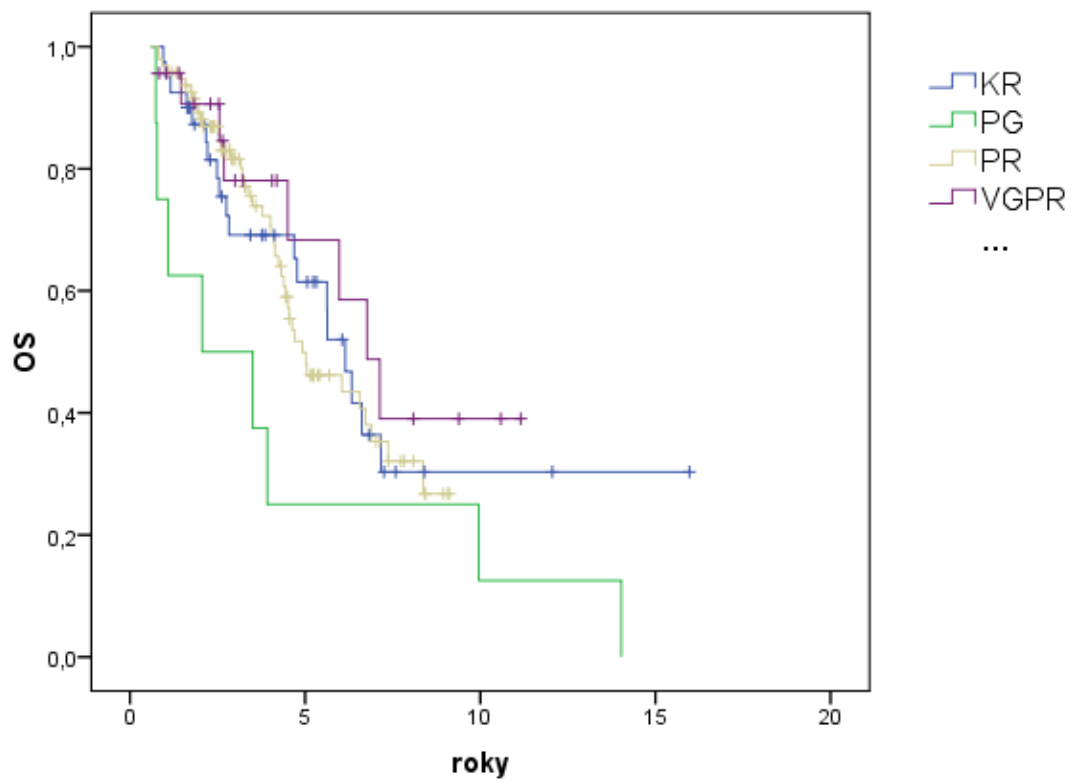
Z další tabulky lze vyčíst estimate, tedy průměrnou dobu resp. medián do události v této skupině s jednoduchou ASCT. Std. Error je střední chyba odhadu průměru. Dále zde popisuje skupinu Konfidence interval, to je interval v kterém s 95% pravděpodobností je odhadovaný průměr. Viz tab. č.9

Tab. č. 9

odp.	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
KR	7,788	1,141	5,552	10,024	6,146	,463	5,239	7,054
PG	4,508	1,730	1,118	7,898	2,062	1,708	,000	5,408
PR	5,661	,337	5,001	6,321	4,923	,792	3,370	6,475
VGPR	7,161	,976	5,247	9,074	6,768	,876	5,051	8,485
Overall	7,177	,568	6,064	8,291	5,634	,647	4,367	6,902

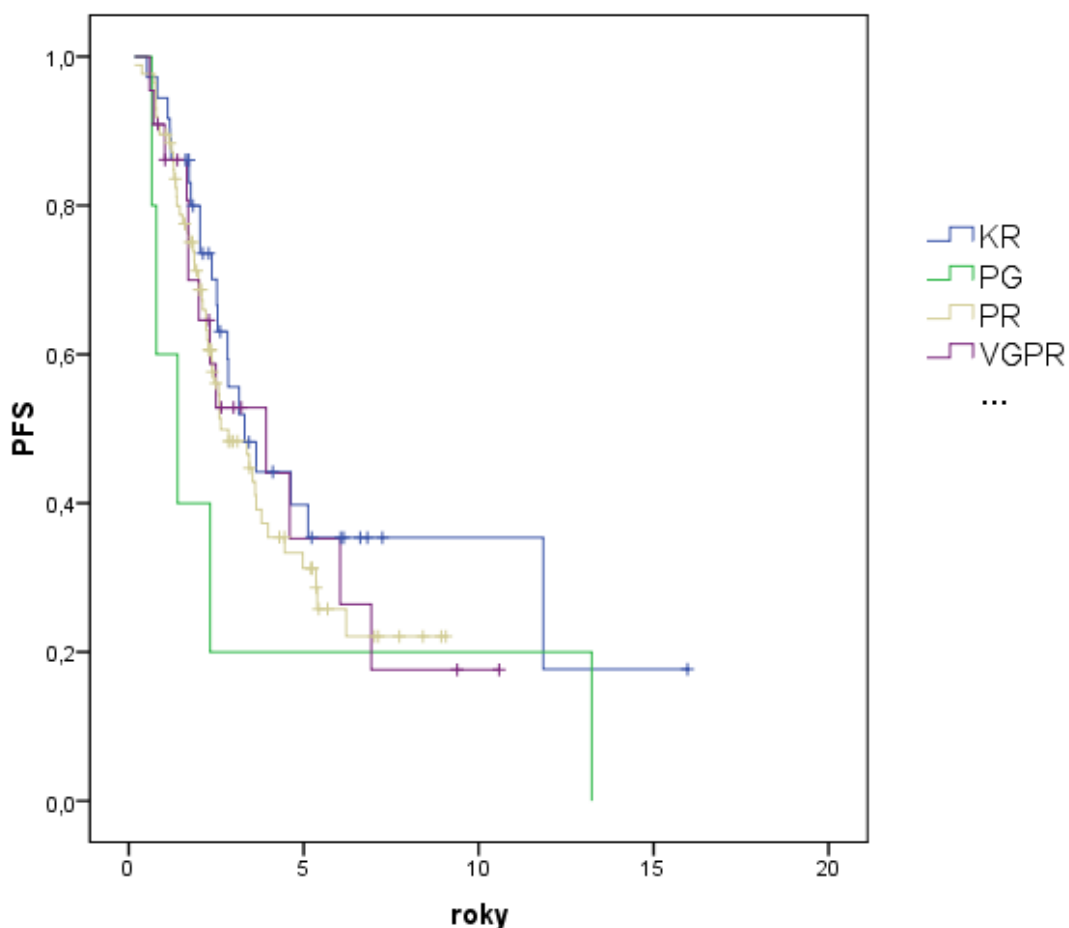
Hledisko celkového přežití skupiny nemocných po jednoduché transplantaci je zřejmé z grafu č. 3.

Graf č. 3



Dále máme skupinu transplantovaných zhodnocenou z hlediska PFS (progression free survival), což je interval od začátku léčby do progresu nebo úmrtí. Viz graf č. 4

Graf. č. 4



3.3. Opakovaná transplantace

Další skupinou, kterou jsme hodnotili podle Kaplan meierova testu nám byli nemocní s opakovanou transplantací periferních kmenových buněk. Výsledky hodnocené stejnou metodou jako u předchozí skupiny vyšli ve stejné formě. Předkládám zde tedy výsledky v podobě tabulek a grafů ze kterých je zřejmé hodnocení odpovědí viz tab. č. 10,11.

Tab. č. 10

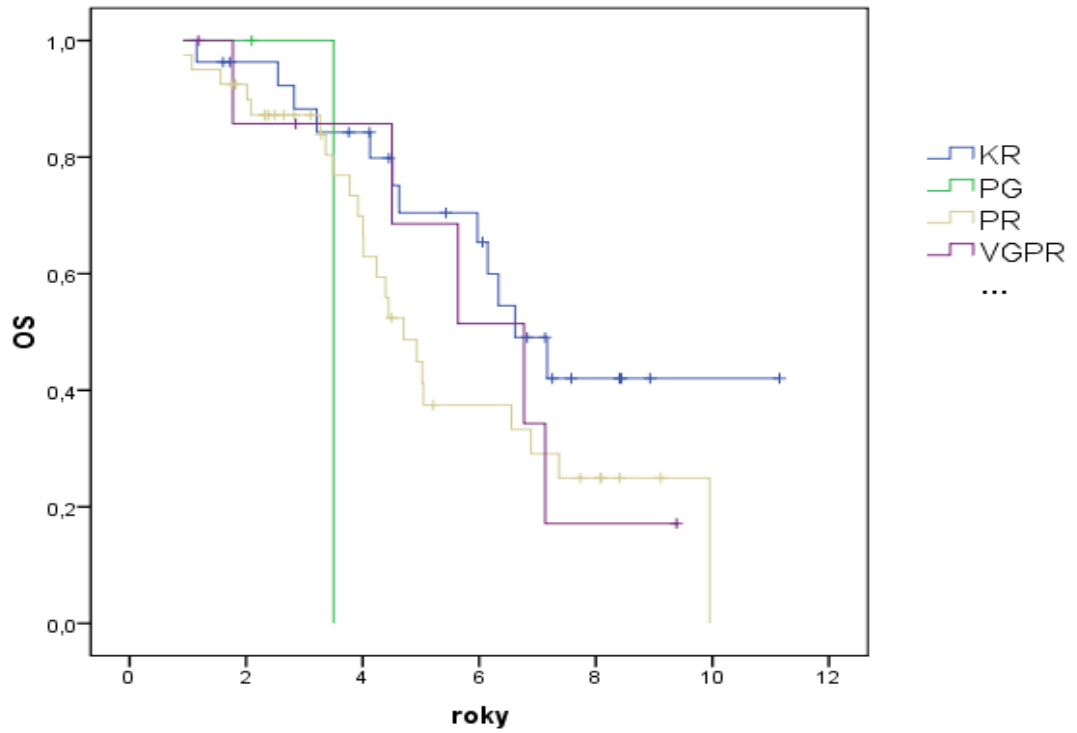
Case Processing Summary				
odpoved	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
KR	27	12	15	55,6%
PG	2	1	1	50,0%
PR	40	23	17	42,5%
VGPR	8	5	3	37,5%
Overall	77	41	36	46,8%

Tab. č. 11

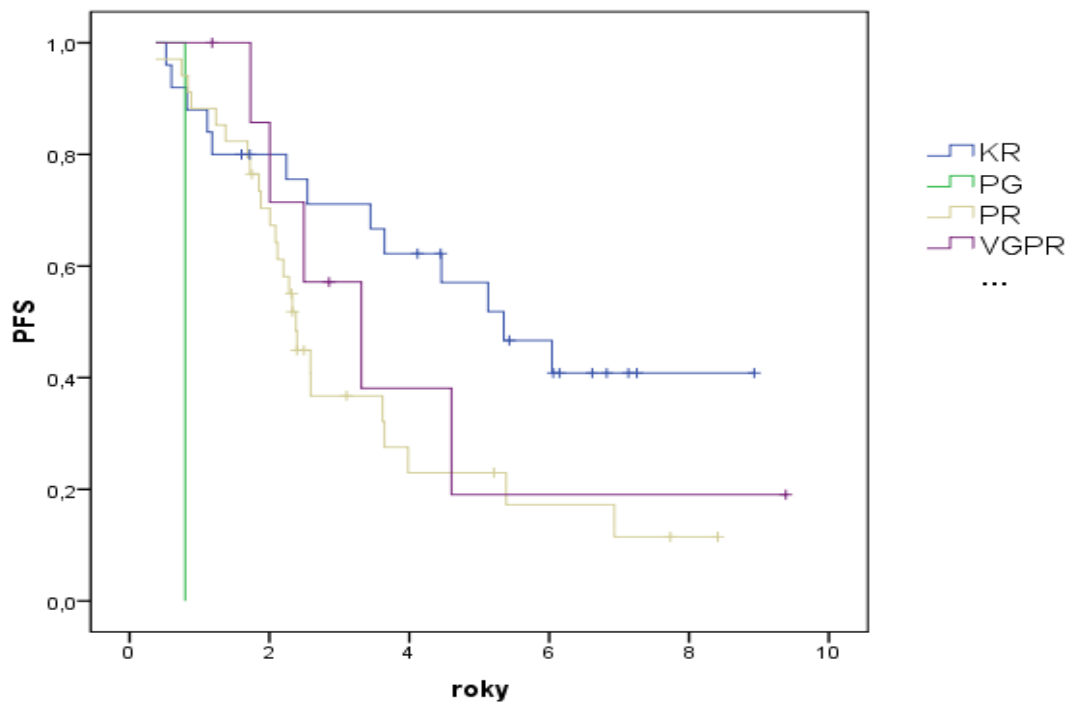
Means and Medians for Survival Time								
Odopoved	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
KR	7,532	,730	6,100	8,963	6,615	,633	5,375	7,855
PG	3,502	,000	3,502	3,502	3,502	.	.	.
PR	5,641	,535	4,593	6,689	4,704	,445	3,831	5,576
VGPR	5,983	,903	4,214	7,752	6,768	1,290	4,240	9,296
Overall	6,347	,426	5,513	7,181	5,971	,797	4,409	7,533

Opakovanou transplantaci podstoupilo 77 pacientů s mnohočetným myelomem. U 27 pacientů došlo ke kompletní remisi, 40 z nich dosáhlo parciální remise, 8 velmi dobré parciální odpovědi, 2 se dostali do progresu. Výsledky transplantovaných z hlediska celkového přežití jsou čitelné z grafu č. 5. PFS tedy interval od začátku léčby do progresu nebo úmrtí je znázorněn na grafu č. 6

Graf č. 5



Graf č. 6



3.3. Výsledky ASCT Overall Survival OS, korelace jednoduchá kontra opakovaná ASCT.

Obě dvě skupiny nemocných, hlavně jejich odpovědi na jednoduchou a opakovanou autologní transplantaci kostní dřeně jsme hodnotili proti sobě také statistickou metodou podle Kaplan Meierova odhadu. Kaplan Meierův odhad neprokázal významný rozdíl mezi jednoduchou či opakovanou ASCT z hlediska celkového přežití. Jen u pacientů po jednoduše transplantaci je statistická tendence k významně různým dobám celkového přežití mezi pacienty v kompletní remisi a v progresi ($p = 0,7$)

4. DISKUZE

Vysokodávkovaná terapie s autologní transplantací krvetvorných buněk je považována v současnosti za standardní léčbu nemocných s mnohočetným myelomem do 65 let věku. S rozvojem autologních transplantací krvetvorných buněk v osmdesátých a zejména v devadesátých letech dvacátého století se indikace mnohočetného myelomu stala druhou nejčastější.

Aby se mohli transplantovat kmenové buňky periferní krve je přirozeně důležitý jejich sběr tzv. separace těchto buněk z periferní krve. Za normálních okolností je počet cirkulujících PBSCs v periferní krvi velmi malý, mnohem menší než v kostní dřeni. Při potlačení funkce kostní dřene chorobou samotnou nebo chemoterapií a imunosupresí počet PBSC vzrůstá, je možno je separovat, zmrazit a použít pro následnou autologní transplantaci kmenových buněk ASCT.

V naší studii jsme sledovali 159 nemocných u nichž se separovali periferní kmenové buňky stimulované dvěma různými metodami. U jedné skupiny se pro stimulaci PBSC použil G – CSF (stimulující růstový faktor) v kombinaci s cyklofosfamidem , u druhé skupiny byl použit G – CSF v kombinaci s IVE (ifosfamid, vepesid, epirubicin)

Pilířem mé práce bylo porovnat tyto dvě metody stimulace z hlediska vlivu na vzrůst počtu kmenových buněk reprezentovaných počtem CD34+ buněk a také časové náročnosti separační procedury. Porovnání proběhlo na pacientech se stejnou diagnózou mnohočetného myelomu. Vedlejším výsledkem bylo vedle separací srovnání následné jednoduché nebo opakované transplantace těchto vytěžených buněk. Porovnání těchto dvou metod ještě nebylo nikým publikováno a to byl částečně důvod proč jsem si toto téma vybral.

Došli jsme k zajímavým výsledkům. Statisticky se totiž jeví IVE jako výhodnější chemoterapeutikum pro zmnožení CD34+ buněk než CFA. Výtěžek CD34+ buněk u IVE mobilizovaných pacientů je v průměru o $14,53 \times 10^6$ CD34+ buněk vyšší než u nemocných mobilizovaných CFA. Tito pacienti zároveň stráví separační procedurou méně času, konkrétně v průměru o 1,84 hodiny méně, čili u některých o den či více kratší dobu separace. Což, jak je po-

psáno výše, znamená menší zátěž pro pacienta a menší finanční zatížení pro zdravotnictví.

Tyto všechny závěry ať už statistické nebo jiné mě vedou k možnému doporučení upřednostnění používání IVE jako stimulační látky před CFA. Ve dvou důležitých kritériích vyšla IVE jako režim, který namnoží větší počet periferních kmenových buněk než CFA a dokáže to za kratší dobu než CFA. Nevýhodou je však o den delší doba hospitalizace k podání této terapie, o něco vyšší cena a možná i zátěž nemocných. Na podrobnou analýzu ekonomické náročnosti obou postupů má práce zaměřena nebyla.

V další části jsme porovnali efekt jednoduché a opakované ASCT. Ve shodě s výsledky dalších autorů nebyl v rámci celé skupiny zaznamenán významný rozdíl. Ten se zřejmě prokazuje jen pro ty pacienty, kteří nevykazují po jednoduché transplantaci dostatečný efekt. Také další sub-analýza výsledků nebyla zadáním mé práce a bude provedena následně.

5. ZÁVĚR

Ve své práci jsem sledoval výsledky různých hodnot u 159 pacientů s mnohočetným myelomem. Podstatnou část práce mě zabralo vyhledávání výsledků u těchto pacientů. U každého nemocného jsem musel vyhledat téměř dvacet údajů jako jsou datum diagnózy, odpovědi na léčbu nebo biochemické hodnoty v séru. Hodnocení výsledků už nebylo tak pracné, avšak ukázalo se, že v případě našeho hlavního cíle, srovnání CFA a IVE bylo dosti přínosné.

Práce prokázala, že mobilizace pomocí IVE se jeví jako výhodnější postup pro zmnožení CD34+ buněk než CFA. Výtěžek CD34+ buněk u IVE mobilizovaných pacientů je vyšší než u nemocných mobilizovaných CFA. Tito pacienti zároveň stráví separační procedurou signifikantně méně času. Dále práce prokázala, že mezi jednoduchou a opakovanou transplantací u pacientů s mnohočetným myelomem není signifikantní rozdíl.

SEZNAM LITERATURY

Petruželka L., Konopásek B., Klinická onkologie, Praha Karolinum 2003

Špička I., Klener P., Mnohočetný myelom – klinické projevy , diagnostika, prognóza, léčba, I. Interní klinika LF UK a VFN, Praha

Durie B.G.M., Salmon S.E., A clinical staging system for multiple myeloma. Cancer, 36, 1975

Špička I, Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, Praha Galén 2005

Ščudla, V. Pokroky v léčbě mnohočetného myelomu. Vnitř. Lék, 1997, 8, s. 529 – 536

Blade J., et al. Kriteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol, 1998, 102, s.1115 – 1123

FACON, T., MENARD, JF., MICHAUX, JL., et al. Prognostic factors tumour mass asymptomatic myeloma. Am J Hematol, 1995, 48, p. 71 – 75.

Petengel R., Morgenstern G., Wolp J., Periferal Blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukaemia using a single apheresis, Blood, Volume 82 s.3770 – 3777

Stroncek D.E, Clay M.E., Smith J., Composition of periferal blood progenitor cell components collected from healthy donors, Transfusion 1997, Volume 37, s.411 – 417

COBE Spektra Apheresis System Essentials Guide

McCullough J., Transfusion Medicine, Elsevier inc. Pennsylvania, 2005 s.131 – 155

McCullough J., Introduction to apheresis donations including history and general principles. In: McLeod B, Price T, Weinstein R, eds. Apheresis: Principles and practice, 2nd edn. Bethesda, MD: AABB Press 2003 29-48

PŘÍLOHA

Při hodnocení výsledků naší práce byl nejdůležitější soubor pacientů a hlavně jejich klinická data. Vyhledání těchto dat bylo pro mne položení základního kamene pro moji diplomovou práci. Pro představu jsem zdrojový soubor těchto dat z kterých jsem vycházel začlenil do přílohy (viz příloha). Kvůli citlivosti údajů jsem vymazal příjmení.