

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Diagnostika a terapie mnohočetného myelomu

MUDr. Alexandra Jungová

Plzeň 2016

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Diagnostika a terapie mnohočetného myelomu

MUDr. Alexandra Jungová

Dizertační práce doktorandského studia

Obor: vnitřní lékařství

Školitel: Doc.MUDr.Samuel Vokurka, Ph.D.

Konzultant: Prof.MUDr.Jan Filipovský,CSc.

-Abstrakt-

Jungová, Alexandra: Diagnostika a terapie mnohočetného myelomu. [Dizertační práce]. Univerzita Karlova v Plzni. Lékařská fakulta; Vnitřní lékařství. Vedoucí práce doc. MUDr. Samuel Vokurka, Ph.D. Plzeň, 2016. 59s.

Mnohočetný myelom je agresivní hematologické onemocnění s rozvíjejícími se možnostmi diagnostiky i léčby v posledních 15 letech. Mezi jednu z diagnostických metod patří průtoková cytometrie, která detekcí spektra antigenů umožňuje odlišit patologické plasmocyty od fyziologických. Jedním ze sledovaných znaků je znak CD 45, který by mohl mít podle našich sledování negativně prognostickou výpovědní hodnotu. 71 pacientů v našem souboru bylo rozděleno podle intenzity exprese CD 45 antigenu a skupina s nižší expresí měla statisticky vyšší riziko relapsu do 12 měsíců 62 % vs. 25 % ($p=0,0011$). Nepozorovali jsme souvislost s vlivy indukční léčby ani cytogenetiky, které se jinak považují za nejdůležitější prognostické markery. Při léčbě mnohočetného myelomu je používána řada kombinovaných protokolů, přičemž za dosud nejefektivnější je stále považována autologní transplantace s možností opakování. Naše výsledky hovoří příznivěji ve prospěch naplánování druhé autologní transplantace časně (tandemově) u pacientů s dosažením pouze parciální remise po 1. linii léčby s autologní transplantací. Signifikantně lepší TFS (treatment free survival) a celkové přežívání (OS) bylo ve skupině pacientů transplantovaných tandemově oproti transplantaci v rámci druhé linie léčby při relapsu/progresi: 18 měsíců vs. 10 měsíců ($p=0,04$) a medián OS nebyl v této skupině dosažen vs. 57 měsíců ($p=0,005$). Dalším poznatkem bylo, že pokud provádíme druhou autologní transplantaci, je vhodnější u rychlých relapsů/progresí zajistit nejprve

cytoredukci systémovou léčbou, jinak v případě pomalého relapsu/progrese nemoci lze transplantovat rovnou.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, průtoková cytometrie, autologní transplantace

-Abstract-

Jungová, Alexandra: Diagnosis and treatment of multiple myeloma.

Multiple myeloma is an aggressive hemato-oncological disease the diagnosis and treatment possibilities of which have been developing for the last 15 years. The diagnostic methods include flow cytometry which uses antigen detection to distinguish between pathological and physiological plasmocytes. One of the monitored markers is marker CD45 which could be, according to our monitoring, of a negative prognostic value. 71 patients in our group were divided according to the intensity of CD45 antigen expression and the group with a lower expression showed a statistically higher risk of relapse within 12 months 62% vs. 25 % ($p=0,0011$). We did not find any connection with the influences of induction therapy or cytogenetics which are otherwise considered the most important prognostic markers.

Multiple myeloma treatment involves a lot of combined protocols; and the repeated autologous transplantation is still considered to be the most efficient. We observed more positive results in planning the second autologous transplant early in patients who reached just partial remission after the 1st autologous transplant - significantly better TFS (treatment free survival) and overall survival (OS) were in the group of patients with early tandem

transplantation: 18 months vs. 10 months ($p=0.04$) and the OS median was not reached in this group vs. 57 months ($p=0.005$). We also learned that if the second autologous transplant is performed in fast relapse/progression, it is more suitable to use systemic treatment to obtain cytoreduction first, and in slow relapse/disease progression, it is possible to transplant directly.

Key words: multiple myeloma, flowcytometry, autologous transplantation

1 Předmluva a poděkování

Mnohočetný myelom je velmi závažné hematologické onemocnění, které postihuje až 500 lidí ročně v České Republice. Toto onemocnění je velmi agresivní, pacienti často trpí bolestmi a dalšími komplikacemi související s nemocí. Během posledních 15 let došlo k velmi prudkému vývoji diagnostických, ale především léčebných metod. Objevilo se mnoho nových léků především z oblasti biologické terapie. I přes to všechno je přežívání pacientů stále poměrně krátké (5-8 let). V diagnostice je snaha o co možná nejsnazší, ale současně nejefektivnější stanovení rizikivosti nemoci s návazností dalšího léčebného managementu. Bohužel je tato nemoc velmi variabilní svým průběhem. Existují obecná doporučení pro léčbu nemoci, ale vždy je nutno brát v úvahu individuální stav pacienta, jeho nemoci, samozřejmě komorbiditu a v neposlední řadě i předpokládanou efektivitu léčby.

Tato práce se zabývá jak diagnostikou, tak léčbou mnohočetného myelomu. Vzhledem k tomu, že se na Hematologicko-onkologickém oddělení zabýváme touto problematikou již desítky let a jako specializované centrum pokrýváme oblast Západočeského, Jihočeského, Karlovarského a částečně i Ústeckého kraje, léčíme ročně více než 300 pacientů s mnohočetným myelomem. Všechna hodnocená data byla získána retrospektivně a všichni pacienti byli léčeni na našem oddělení.

Velmi ráda bych poděkovala nejvíce mému školiteli, doc. MUDr. Samuelu Vokurkovi, Ph.D, který se mi celé postgraduální studium poctivě věnoval a pomáhal mi velmi cennými radami. Dále bych chtěla poděkovat prim. MUDr. Vladimíru Kozovi a poté i prim. MUDr. Pavlu Jindrovi, Ph.D, díky kterým mi bylo studium na pracovišti umožněno.

Celou práci jsem psala samostatně, veškerá data jsem si zpracovala sama na souboru pacientů Hematologicko-onkologického oddělení.

-Použité zkratky-

CD – cluster of differentiation, znak na povrchu buněk
CMG – Czech myeloma group, Česká myelomová společnost
CR – complete remission, kompletní remise
CRAB – zkratka používaná pro diagnostické znaky nemoci (C-calcium, R-renal, A-anemia, B-bone lesions)
DNA – deoxyribonukleová kyselina
ELFO - elektroforéza
FACS – flowcytometrie, průtoková cytometrie
HDAC – inhibitory histon deacetylázy
IMWG – International myeloma working group
ISS – mezinárodní stagingové skóre
MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu
MM- mnohočetný myelom
MR – minimální response
OS – overall survival, celkové přežívání
PBSC – periferní krvetvorné buňky
PR – partial remission, parciální remise
RANKL - receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
SD – stable disease, stabilní nemoc
TFS – treatment free survival, přežití bez léčby
TTP – time to progression, doba do progresu
Tx – transplantace

-Obsah-

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
1. Předmluva a poděkování	6
Použité zkratky	7
2. Mnohočetný myelom.....	10
2.1. Definice, klasifikace.....	10
2.2. Epidemiologie, etiologie.....	10
2.3. Klinické projevy.....	10
2.3.1. Postižení kostní dřeně.....	10
2.3.2. Postižení skeletu.....	11
2.3.3. Postižení ledvin- myelomová nefropatie.....	11
2.3.4. Neurologická postižení.....	12
2.3.5. Hyperviskozita.....	12
2.3.6. Další orgánová, metabolická postižení a imunodeficit.....	12
2.4. Diagnostika.....	13
2.4.1. Diagnostická kritéria dle Salmona Durie.....	13
2.4.2. Dělení dle CRAB kritérií dle IMWG 2014.....	15
2.4.3. Mezinárodní prognostický index - ISS, Greipp, 2005.....	15
2.4.4. Stádia mnohočetného myelomu.....	16
2.4.4.1. MGUS.....	16
2.4.4.2. Asymptomatický MM	17
2.4.4.3. Symptomatický mnohočetný myelom.....	17
2.4.5. Diagnostické metody.....	17
2.4.5.1. Krevní obraz	17
2.4.5.2. Biochemie.....	17
2.4.5.3. Elektroforéza.....	17
2.4.5.4. Cytologie kostní dřeně.....	18
2.4.5.5. Průtoková cytometrie, flowcytometrie.....	18
2.4.5.6. Cytogenetika.....	19
2.5. Vlastní výzkum v diagnostické oblasti - hodnocení exprese antigenu CD 45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresse nebo relapsu	
2.5.1. Úvod.....	20
2.5.2. Materiál a metodika.....	21
2.5.3. Průtoková cytometrie.....	24
2.5.4. Genetické analýzy.....	25
2.5.5. Statistické zpracování.....	26
2.5.6. Výsledky.....	26
2.5.7. Diskuse.....	28
2.5.8. Souhrn a závěr	30
2.5.9. Použitá literatura.....	31
3. Léčba mnohočetného myelomu.....	34
3.1. Léčba obecně.....	34
3.2. Léčba pacientů do 65 let.....	35
3.3. Léčba pacientů nad 65 let.....	35
3.4. Autologní transplantace.....	35
3.5. Alogenní transplantace.....	36

3.6. Nové léky v léčbě mnohočetného myelomu.....	37
3.6.1. Inhibitory proteasomu.....	37
3.6.2. Imunomodulační léky.....	37
3.6.3. Monoklonální protilátky.....	37
3.6.4. Inhibitory deacetylázy (HDAC).....	38
3.7. Vlastní výzkum v terapeutické oblasti - porovnání autologní transplantace krvinek realizované tandemově nebo v relapsu nemoci u pacientů s mnohočetným myelomem.....	39
3.7.1. Úvod.....	39
3.7.2. Metodika.....	40
3.7.3. Statistické zpracování	44
3.7.4. Výsledky.....	44
3.7.5. Diskuse.....	48
3.7.6. Souhrn a závěr.....	51
3.7.7. Použitá literatura.....	53
Příloha 1: Publikační činnost doktorandky.....	57

2 Mnohočetný myelom

2.1. Definice, klasifikace

Mnohočetný myelom (MM) je poměrně časté hematologické onemocnění se zastoupením až 15 % v rámci hematologických malignit a až 1% v rámci všech nádorových onemocnění. Onemocnění je charakterizované klonální proliferací maligně transformovaných plasmatických buněk s produkcí monoklonálního imunoglobulinu - paraproteinu (M-proteinu) a to buď celé molekuly (IgG, IgA, IgM, IgD) nebo jen její lehké části (řetězce kappa, lambda).

2.2. Epidemiologie, etiologie

Incidence MM se pohybuje v rozmezí 1-4 osob/100 000 obyvatel ročně, ve věkové kategorii 75-79 let je však incidence této nemoci až 16 osob/100 000 obyvatel (5). Častěji postihuje muže a je častější u afroameričanů (18). Etiologie nemoci nebyla zatím spolehlivě zjištěna. Jsou známy rizikové faktory jako je obezita nebo kontakt s organickými rozpouštědly či dioxiny nebo vystavení záření.

2.3. Klinické projevy

2.3.1. Postižení kostní dřeně

Nadměrnou proliferací patologické populace plasmocytů dochází k útlaku ostatních krvetvorných řad, navíc tato populace produkuje mnoho cytokinů jako je interleukin 6, TNF-alfa, VEGF a všechny tyto působky pak umožňují dlouhodobé přežívání a adhezi myelomových buněk v mikroprostředí kostní dřeně (8). Jako nejčastější klinický projev bývá patrná anémie, méně často pak leukopenie či trombocytopenie.

2.3.2. Postižení skeletu

Patologický imunoglobulin (paraprotein, M protein) aktivuje mediátory (např. MIG-1 alfa, RANKL – více viz kapitola 2.3.6.), aktivující osteoklasty a naopak inhibující aktivitu osteoblastů a dochází tedy ke vzniku osteolytických ložisek vlivem převahy odbourávání kostní hmoty nad její novotvorbou. Nejčastěji jsou postiženy dlouhé kosti skeletu (femury, humery), lebka a páteř. Velkým rizikem při takovémto postižení je možnost patologické fraktury. Nejzávažnější variantou je kompresivní fraktura osového skeletu (C a Th páteř) s rizikem útlaku míchy.

2.3.3. Postižení ledvin – myelomová nefropatie

Poškození ledvin se děje na několika úrovních v závislosti na typu imunoglobulinu, hlavně lehkého řetězce. Nejčastějším typem poškození ledvin je akutní tubulární nekróza, která je způsobena odliťkovou nefropatií (cast nephropathy) (40-60%) (19) – je zde postižen proximální i distální tubulus nefronu. Méně často pak může být ledvina postižena ukládáním depozit lehkých řetězců v amyloidové podobě (cca 20%) (11), event. i jako forma glomerulonefritidy. Projevit se může toto postižení proteinurií (nejčastěji jako pozitivní Bence Jonesova bílkovina v moči), nefrotickým syndromem (častěji při amyloidóze), elevací renálních testů a také renálním selháním.

2.3.4. Neurologické poruchy

Ukládání paraproteinu do nervových tkání může způsobit nejčastěji neuropatii klinicky charakterizovanou senzoričkou, méně často motorickou poruchou.

2.3.5 Hyperviskozita

Při vysokých koncentracích paraproteinu (cca více než 70g/l) může dojít k projevům hyperviskozity jako jsou bolesti hlavy, epistaxe, oční poruchy, brnění konečků prstů.

2.3.6. Další orgánová, metabolická postižení a imunodeficit

Při osteolytické destrukci kosti se uvolňuje vápník s následnou hyperkalcémií v krvi. Na hyperkalcémii při odbourávání kosti se podílí jak samotné myelomové buňky, tak interleukin 1 a 6 (tvořené myelomovými i stromálními buňkami kostní dřeně), které jsou samy stimulatory osteolýzy (1), tak RANKL- receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. RANKL je antigen na povrchu osteoblastů a je to faktor stimulující diferenciaci osteoklastů.

Paraprotein, buď kompletní molekula nebo i samotné lehké řetězce, interaguje s trombocyty a navozuje trombocytopenii ve smyslu poruchy agregace (nebývají však patrné změny v běžných laboratorních koagulačních testech, ikdyž při vysokých hodnotách paraproteinu může být zastiženo prodloužené APTT). Méně častá je opačná varianta s hyperkoagulačním stavem.

Při nadprodukcí patologické plasmocytární populace dojde k útlaku zdravé lymfocytární populace, která za normálních okolností tvoří polyklonální imunoglobuliny. Zpočátku klesá B imunitní odpověď (klesá tvorba polyklonálních Ig po antigenní stimulaci), později i T buněčná odpověď (20). Vlivem tohoto jsou pacienti vnímavější k infekcím.

2.4. Diagnostika

2.4.1. Diagnostická kritéria dle Salmona a Durie

V běžné praxi mohou být ještě někde doposud používána původní diagnostická kritéria dle Salmona a Durie (viz tabulka 1), přičemž v platnost nastoupily nové a běžně již zavedené aktualizace dle IMWG - více viz odst. 2.4.2.

Tabulka 1 – Diagnostická kritéria dle Salmona a Durie

Velká kritéria	Malá kritéria
Histologie tkáně (plasmocytom)	10-30 % plasmocytů
Počet plasmocytů nad 30%	Koncentrace paraproteinu nižší než ve velkých kritériích
Koncentrace paraproteinu: IgG více než 35 g/l IgA více než 20 g/l Množství řetězců v moči více než 1 g/24 hodin	Pokles fyziologických Ig IgM pod 0,5 g/l IgA pod 1 g/l IgG pod 6,0 g/l
	Přítomna osteolytická ložiska
Jistá diagnóza MM – 1 velké + 1 malé kritérium nebo minimálně 3 malá kritéria	

Dále toto dělení z r. 1975 odlišuje nemoc na 3 stádia odrážející klinické a laboratorní postižení nemocí. Subklasifikace podle hodnoty renálních testů má prognostický význam.

Tabulka 2 – Stádia nemoci dle Salmona a Durie

I. stádium	Jsou splněny všechny níže uvedené podmínky: koncentrace Hb > 100 g/l koncentrace kalcia < 3 mmol/l normální kostní struktura anebo solitární kostní ložisko plasmocytomu relativně nízká koncentrace M-Ig: a) M-IgG < 50 g/l b) M-IgA < 30 g/l c) exkrece lehkých řetězců v moči < 4 g/24 hodin
II. stádium	Nejsou splněny podmínky prvního ani třetího stádia
III. stádium	Je splněna alespoň jedna z následujících podmínek: koncentrace hemoglobinu < 85 g/l zvýšená koncentrace kalcia nad 3 mmol/l pokročilé postižení skeletu s mnohočetnými osteolytickými ložisky a/nebo zlomeninami vysoké koncentrace M-Ig: a) M-IgG > 70 g/l b) M-IgA > 50 g/l c) vyloučení 12 g lehkých řetězců moče za 24 hodin

Subklasifikace:

A - kreatinin < 177 μ mol/l

B - renální insuficience s retencí dusíkatých látek, kreatinin > 177 μ mol/l

2.4.2 Dělení dle CRAB kritérií dle IMWG 2014

Novějším diagnostickým schématem je tzv. CRAB podle IMVG (International Myeloma Working Group), kdy musí být splněna přítomnost minimálně 10% plasmocytů v kostní dřeni a minimálně jednoho z kritérií CRAB (viz tabulka 3).

Tabulka 3 – CRAB kritéria

C- hyperkalcémie	Kalcium > 2.75 mmol/l
R - renální postižení	Kreatinin > 176,8 umol/l
A - anémie	Hemoglobin < 100g/l nebo 20 g/l pod dolní limit
B - „bone“ kostní změny	Lytická kostní ložiska nebo osteoporóza s kompresivními frakturami
Ostatní	Hyperviskozita, opakované bakteriální infekce více než 2/ rok

Od roku 2014 je přidán dodatek, že pokud je v kostní dřeni více než 60% plasmocytů, nebo je poměr kappa/lambda ratio větší než 100 a nebo je alespoň jedno lytické ložisko větší než 5 mm, je diagnóza MM jistá a není již nutné splnění žádného z CRAB kritérií.

2.4.3. Mezinárodní prognostický index - ISS, Greipp, 2005

Tento prognostický index je stanoven na základě hodnoty beta-2-mikroglobulinu a albuminu v době diagnózy a je prognosticky významný.

Tabulka 4 – Mezinárodní prognostický index ISS

Klinické stádium	Beta-2-mikroglobulin	Albumin v g/l
1	< 3.5	>35
2	<3.5 nebo 3.5-5.5	< 35 >35
3	>5.5	

2.4.4. Stádia mnohočetného myelomu

2.4.4.1. MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu – monoklonální M protein pod 30g/l, počet plasmocytů do 10% v kostní dřeni a není patrné poškození orgánů ani kostní ložiska podle CRAB kritérií. Není také přítomna AL amyloidóza.

2.4.4.2. Asymptomatický MM – přítomnost M proteinu nad 30 g/l nebo více než 10% plasmocytů v kostní dřeni s nižší hladinou M proteinu, ale není přítomno poškození orgánů ani kostní ložiska a nejsou symptomy CRAB.

2.4.4.3. Symptomatický MM - je přítomen M protein v jakékoliv kvantitě, v kostní dřeni je nad 10% plasmocytů nebo je histologicky verifikován plasmocytom a je přítomno postižení tkání dle CRAB definic.

2.4.5. Diagnostické metody

2.4.5.1. Krevní obraz

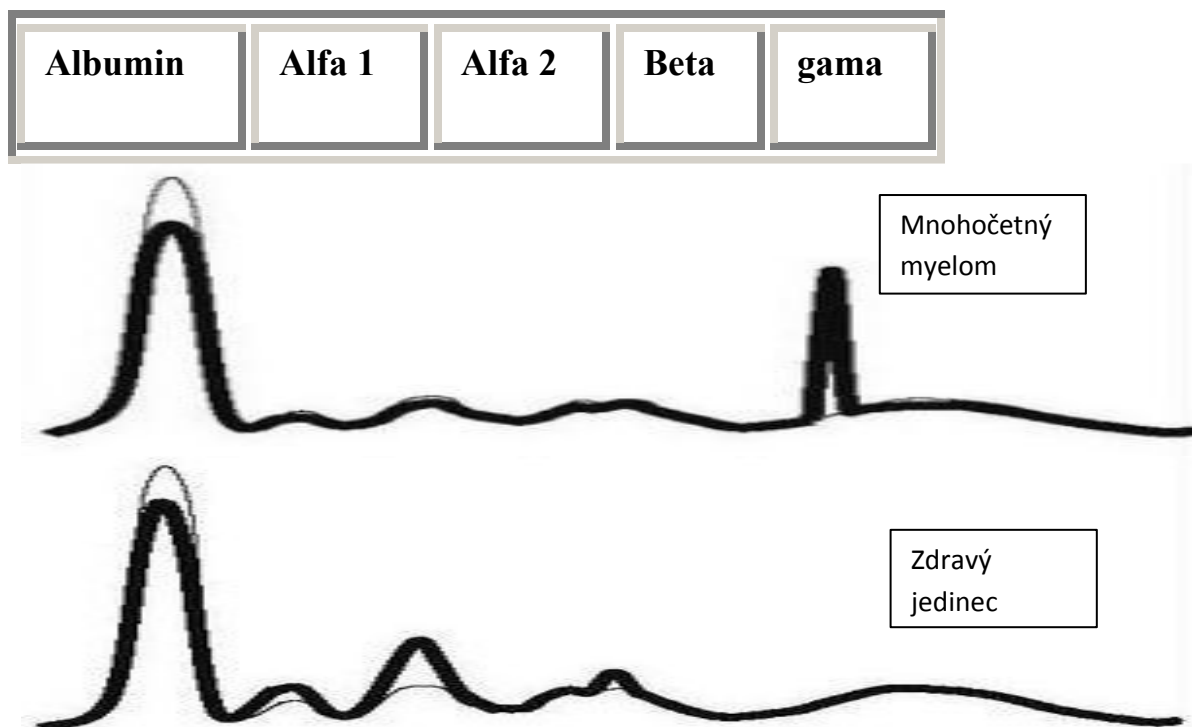
Krevní obraz je nespecifickou diagnostickou metodou, prvním ukazatelem nemoci může mít anémie jakékoliv hloubky, častěji mikrocytární hypochromní.

2.4.5.2. Biochemie

Ve standardním biochemickém vyšetření může na diagnózu MM poukázat vysoká hladina celkové bílkoviny, nízká hladina albuminu, elevace renálních testů či vápníku.

2.4.5.3. Elektroforéza

Zásadní diagnostickou laboratorní metodou je elektroforéza bílkovin. Provádí se jak ze séra, tak z moče, kde se elektroforeticky stanovuje přítomnost paraproteinu.



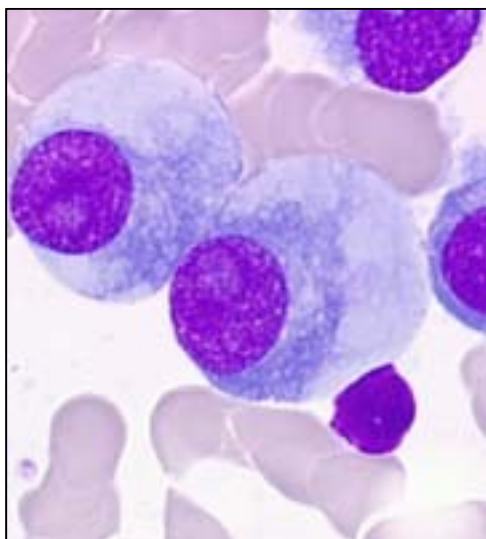
Obrázek 1 Ilustrace - Křivka elektroforézy u pacienta s mnohočetným myelomem a u zdravého člověka (upraveno ze zdroje MUDr. Martin Vejražka, PhD., MUDr. Lenka Fialová CSc.).

Pro jeho bližší určení včetně antigenní složky kappa nebo lambda se provádí imunofixací. Součástí tohoto vyšetření je v poslední době i kvantifikace

lehkých řetězců, kdy se využívá vazby protilátky na epitop lehkého řetězce a dokáže tak odlišit řetězce volné a vázané. Poslední částí imunobiochemického vyšetření je stanovení koncentrace polyklonálních Ig, kdy bývá pokles fyziologických Ig na úkor paraproteinu.

2.4.5.4. Cytologie kostní dřeně

Standardně se provádí vyšetření kostní dřeně z odběru sternální punkcí. Pro diagnózu je nezbytná přítomnost alespoň 10 % plasmocytů. Pokud není odběr sternální punkcí dostatečně diagnostický při důvodném podezření na myelom, je nutné doplnit vyšetření histologické – trepanobiopsií.



Obrázek 2 – Morfologie plasmocytu (zdroj: www.myeloma.org)

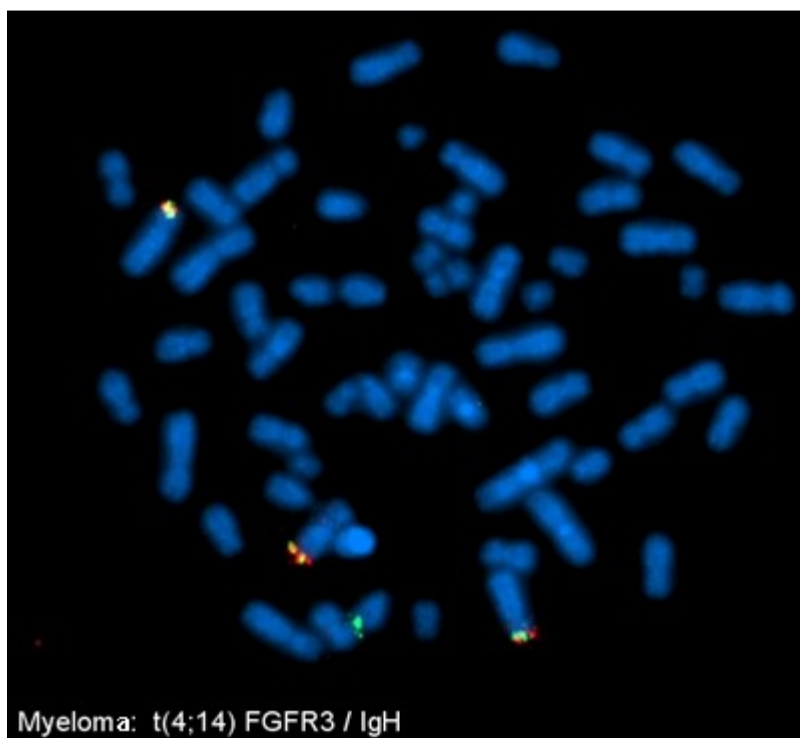
2.4.5.5. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flowcytometrie, FACS) je metoda založená na detekci povrchových znaků na vyšetřovaných buňkách. Pro plasmocyty je známo, že na jejich povrchu je znak CD38. Tento je jak na zdravých, tak na maligních buňkách ve stejné míře. Odlišení je možné podle dalších znaků, kdy zdravé

plasmatické buňky jsou CD19+CD56- a zralé myelomové buňky naopak CD19-CD56+ (12).

2.4.5.6. Cytogenetika

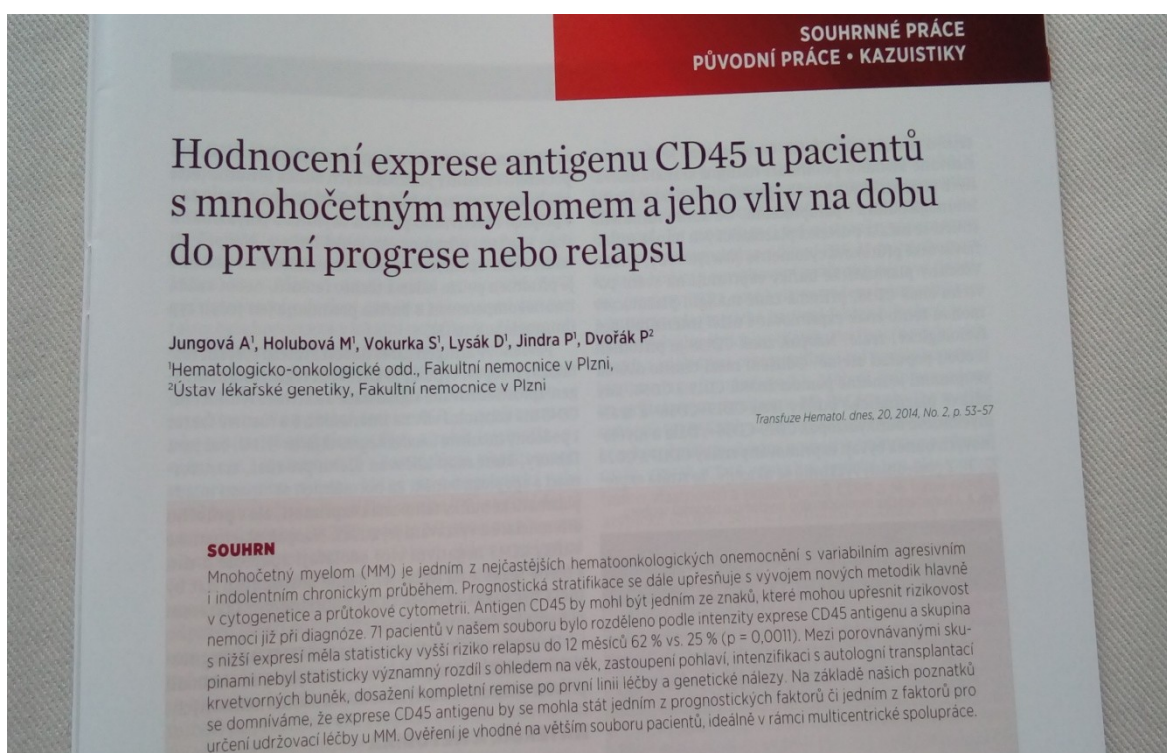
Cytogenetické vyšetření je nezbytné pro prognostickou stratifikaci MM. Mezi příznivé varianty se počítá hyperdiploidie a t(11;14). Naopak jako MM s nepříznivou prognózou je považována t(4;14), t(14;16), t(14;20), del 17p nebo změny 1 chromozomu krátkého i dlouhého raménka (3).



Obrázek 3 – Cytogenetický nález t(4;14) (Zdroj:Atlas cytogenetiky – www.atlasgeneticsoncology.org)

2.5. Vlastní výzkum v diagnostické oblasti - hodnocení exprese antigenu CD 45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresse nebo relapsu

Publikováno v roce 2014: JUNGOVÁ, A., VOKURKA, S., HOLUBOVÁ, M., DVOŘÁK, P. *Hodnocení exprese antigenu CD45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresse nebo relapsu.* Transfuze a hematologie dnes. 2014, **20**(2), 53-57.



2.5.1. Úvod

Od konce minulého století se začala v detekci plasmatických buněk uplatňovat také průtoková cytometrie (flow cytometrie; FACS). Všechny plasmatické buňky exprimují na svém povrchu znak CD 38, přičemž zralé maligní plasmocyty mohou tento znak exprimovat s nižší intenzitou než fyziologické, zralé. Naopak znak CD 138 je přítomen u obou populací stejně.

Odlišení mezi těmito dvěma skupinami je možné pomocí znaků CD 19 a CD 56, kdy zdravé plasmatické buňky jsou CD19+CD56- a zralé myelomové buňky naopak CD19-CD56+. Dále u myelomových buněk bývají exprimovány znaky CD 117 a CD 20 (12,15). Z posledních výzkumů se ukazuje, že ztráta exprese CD 20 znaku je spojena s agresivnější nemocí (2). Pro potvrzení klonality plasmatických buněk je nutno ještě analyzovat expresi lehkých řetězců kappa a lambda – v případě reaktivního procesu se jedná o polyklonální stav, kdy jsou přítomny oba lehké řetězce. Naopak při nádorovém onemocnění jde o monoklonální proces – je přítomen pouze jeden z těchto řetězců, neboť každá imunokompetentní B buňka produkuje jen jeden typ imunoglobulinu (7).

Povrchový antigen CD 45 neboli Protein tyrosin fosfatáza, receptor typu C, je klíčovým regulátorem antigen-zprostředkované signalizace a aktivace lymfocytů. CD 45 má kontrolní vliv na interleukin 6 a růstový faktor 1 podobný inzulinu (*insulin-like growth factor 1*) (4), což jsou faktory, které mají klíčovou úlohu pro růst, transformaci a apoptózu buněk. Za normálních okolností mladé plasmatické buňky tento znak exprimují, ale v průběhu diferenciaci a vyžívání jej ztrácí. Naopak plasmatické buňky CD 45 negativní více odolávají apoptóze a tím i méně reagují na léčbu (6). Podle dostupných dat by měla být nízká exprese CD 45 nepříznivým faktorem ovlivňující časnost progresu (16).

Ve snaze ověřit význam antigenu CD 45 na prognostické stratifikaci u pacientů s MM jsme se rozhodli provést následnou analýzu souboru našich nemocných.

2.5.2 Materiál a metodika

Retrospektivní analýza pacientů s MM s cílem porovnat dobu do první progresu/relapsu (TTP) s ohledem na expresi CD 45 znaku ve skupině

s nízkou expresí „*dim*“ oproti skupině s vyšší expresí „*bright*“ (viz obrázek 4). Analyzovaný soubor tvořilo celkem 71 pacientů s mnohočetným myelomem nově diagnostikovaným v období 5/2011 až 12/2012 na našem pracovišti. Medián věku pacientů byl 58 (38-72) let. U všech pacientů byla zahájena indukční léčba s podáním 4 cyklů chemoterapie většinou s použitím nových léků (protokoly CTD, CVD, RD, VD, VMP) (5), pouze u 4 pacientů (5 %) se jednalo o protokoly bez použití nových léčiv a celkem 62/71 (87 %) pacientů dále podstoupilo cyklus vysoko dávkované chemoterapie s melfalanem a autologní transplantací periferních krvetvorných buněk. Pouze u 12 % pacientů autologní transplantace nebyla provedena buď z důvodu věku, nebo z důvodu špatné mobilizace periferních buněk. Vyšetření kostní dřeně včetně vyšetření cytogenetického a průtokovou cytometrií pro naše sledování bylo provedeno vstupně v době diagnózy. Charakteristiky souboru jsou dále uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 - Charakteristiky mnohočetného myelomu u pacientů souboru výzkumu

Počet pacientů:	71		
	Dim (n=25)	Bright (n=46)	
Pohlaví, muži / ženy:	13/12	24/22	p= 1.0
Věk v době diagnózy – medián (min – max):	58 (38-67)	62 (40-72)	p= 0.30
Medián sledování	18 (8-44)	22 (1-107)	p= 0.08
Stádium Salmon-Durie:			
IIIA	17 (68%)	25 (55%)	p= 0.69
IIIB	5 (20%)	8 (17%)	p= 1.0
ostatní	3 (12%)	13 (28%)	p= 0.25
Stádium ISS:			
1.	3 (12%)	12 (26%)	p= 0.37
2.	6 (24%)	13 (28%)	p= 1.0
3.	14 (56%)	20 (44%)	p= 0.67

neznámé	2 (8%)	1 (2%)	p= 0.55
Genetika:			
normální karyotyp	4 (16%)	10 (22%)	p= 0.76
t (4;14)	4 (16%)	3 (7%)	p= 0.41
komplexní aberace	2 (8%)	5 (11%)	p= 1.0
del, monosomie 17 (resp. mutace p53)	1 (4%)	1 (2%)	p= 1.0
t (11;14), hyperdiploidie	3 (12%)	6 (13%)	p= 1.0
ostatní nebo neprovedené	11 (44%)	21 (45%)	p= 1.0
Chemoterapie 1. linie:			
CTD	9 (36%)	23 (50%)	p= 0.51
CVD,VD	13 (52%)	19 (41%)	p= 0.66
VMP, RD	2 (8%)	1 (2%)	p= 0.55
Jiné (VAD, CID, CAD)	1 (4%)	3 (7%)	p= 1.0
Autologní transplantace v 1. linii:	23 (92%)	39 (85%)	p= 0.86
Léčebná odpověď po 1. linii léčby			
CR	5 (20%)	13 (29%)	p= 0.78
VGPR+ PR	18 (72%)	25 (55%)	p= 0.55
SD, MR	1 (4%)	0	p= 0.36
neznámá	1 (4%)	7 (16%)	p= 0.26

TTP byla definována jako doba od ukončené indukční léčby do první progrese/relapsu. TTP od ukončené léčby nikoliv od zahájení léčby jsme zvolili z důvodu lepší dostupnosti a validity dat z období ukončené léčby. Poměrná část pacientů totiž pocházela ze spádových nemocnic a validita výsledků byla velmi rozdílná, od ukončení indukční léčby byla většina pacientů již léčena v našem centru. Diagnostika MM vycházela z kritérií IMWG (5). U pacientů bylo vstupně a dále ve velké části případů i po ukončení indukční léčby provedeno vyšetření kostní dřeně – morfologické, cytologické, FACS a cytogenetické vyšetření. Detekce přítomnosti

paraproteinu byla hodnocena v lokální certifikované laboratoři s využitím metodiky elektroforézy a imunofixace.

Dosažení léčebných odpovědí bylo definováno podle standardních kritérií IMWG (5) zahrnujících ve stručnosti: Kompletní remise (CR) – nepřítomnost původního M-proteinu v séru a moči imunofixací, méně než 5 % plasmocytů v kostní dřeni, nepřítomnost extraoseálního nádoru, žádná nová osteolytická nebo narůstající ložiska. Parciální remise (PR) a velmi dobrá parciální remise (VGPR): pokles M-proteinu a regrese plasmocytomových mas měkkých tkání o nejméně 50 % (v případě VGPR pokles nejméně o 90 %) a žádná nová nebo narůstající osteolytická ložiska. Minimální odpověď (MR): pokles M-proteinu a regrese plasmocytomových mas měkkých tkání o 25-49 %, žádná nová nebo narůstající osteolytická ložiska. Relaps: nová aktivita nemoci (infiltrace dřeně, M-protein, extraoseální tumor) po předchozí CR. Progrese: nárůst aktivity o 25 % (M-protein, infiltrace dřeně, tumor) po předchozí PR nebo MR.

Po ukončení první linie léčby byly vyšetřovány hladiny M-proteinu v séru a moči elektroforézou a imunofixací v cca 3 měsíčních intervalech po ukončení léčby.

2.5.3. Průtoková cytometrie

Na stanovení imunofenotypu plasmatických buněk byla použita kombinace značení povrchových a intracytoplazmatických znaků. Pro detekci povrchových znaků bylo 100 μ l kostní dřeně inkubováno 15min ve tmě při pokojové teplotě s monoklonálními protilátkami: CD45Horzion V500 (BD Bioscience, USA), CD28-FITC, CD20-Pacific Blue, CD8-PerCP (vše Exbio, ČR), CD117-PE, CD138-APC, CD38-APC-AF750 (vše Immunotech, USA) a CD45-HorizonV500 (BD Bioscience, USA), CD56-Pacific Blue (Exbio), CD19-PE-Cy7, CD138-APC, CD38-APC-AF-750 (Immunotech). U první zkumavky byly po inkubaci lyzovány erytrocyty pomocí komerčního roztoku

BD FACS Lysing Solution (BD Bioscience) s následným promytím PBS (fyziologický roztok s fosfátovým pufrům) a centrifugací. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta byla rozvolněna v 0,5ml PBS. U druhé zkumavky byly buňky s povrchovým značením nejprve fixovány, promyty PBS a poté byla provedena permeabilizace a intracytoplazmatické barvení lehkých řetězců s využitím polyklonálních protilátek. Pro fixaci povrchových znaků a následnou permeabilizaci byl použit komerční kit IntraPrep (Immunotech). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru BD FACSCanto II s využitím software BD FACSDiva. Identifikace plasmocytů proběhla sekvenčním značením pomocí kombinace antigenů CD 38, CD 138, CD 45 v lokalitě typické pro plasmocyty (scatter vlastnosti) a podle znaků CD 19 a 56 jsme odlišili atypické (CD19-, 56+) a normální plasmocyty (CD19+, 56-). Pro detekci MRD byl limit sensitivity 0,01 % (10^{-4}).

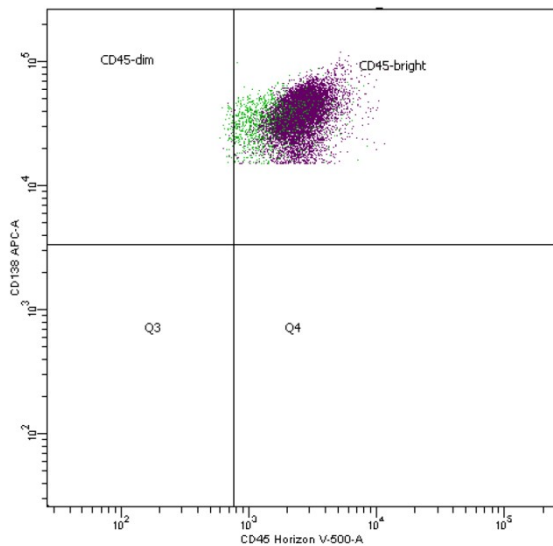
2.5.4. Genetické analýzy

Cytogenetická vyšetření a jejich výsledky byly dostupné u 63/71 (89 %) pacientů. Specificky byl sledován výskyt prognosticky nepříznivých změn (3) v podobě komplexních aberací karyotypu, delece 17p (resp. delece genu TP53), t(4;14)(p16;q32) a t(14;16)(q32;q23). Buňky kostní dřeně byly pro cytogenetické vyšetření kultivovány 24 hodin v médiu bez stimulace specifickými mitogeny. Pro analýzu chromosomů byla použita metoda G-pruhování. Cytogenetická analýza byla prováděna dle mezinárodních doporučení pro mnohočetný myelom a výsledek byl zapsán dle ISCN 2013 nomenklatury. Metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace) byla prováděna s plasmocyty imunoznačenými pro specifickou analýzu patologických buněk (cIg-FISH). Byly používány komerčně dostupné FISH sondy od firem Abbott a Kreatech dle návodů daných výrobcem.

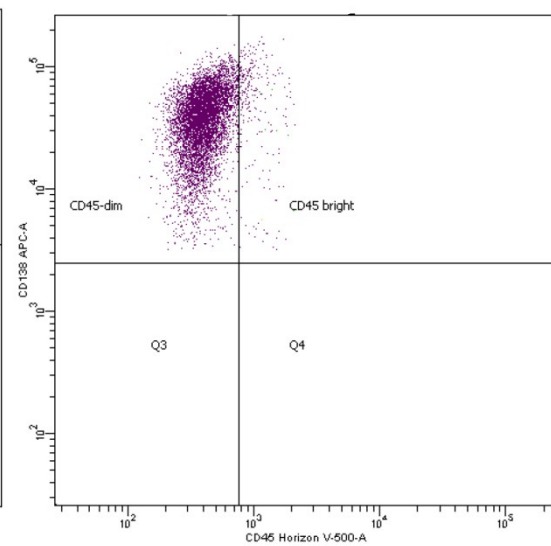
2.5.5. Statistické zpracování

Provedeno s využitím programu GraphPad InStat - Statistica Software a základních statistických testů – Mann-Whitney, Fisher's Exact Test a t-test. Křivky pravděpodobnosti progrese a TTP byly zpracovány Kaplan-Meier metodikou a vyhodnocení významnosti statistických rozdílů bylo provedeno log-rank testem (software MedCalc) Rozdíly mezi skupinami byly testovány na hladině 95% významnosti a hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za staticky významné rozdíly.

1A



1B



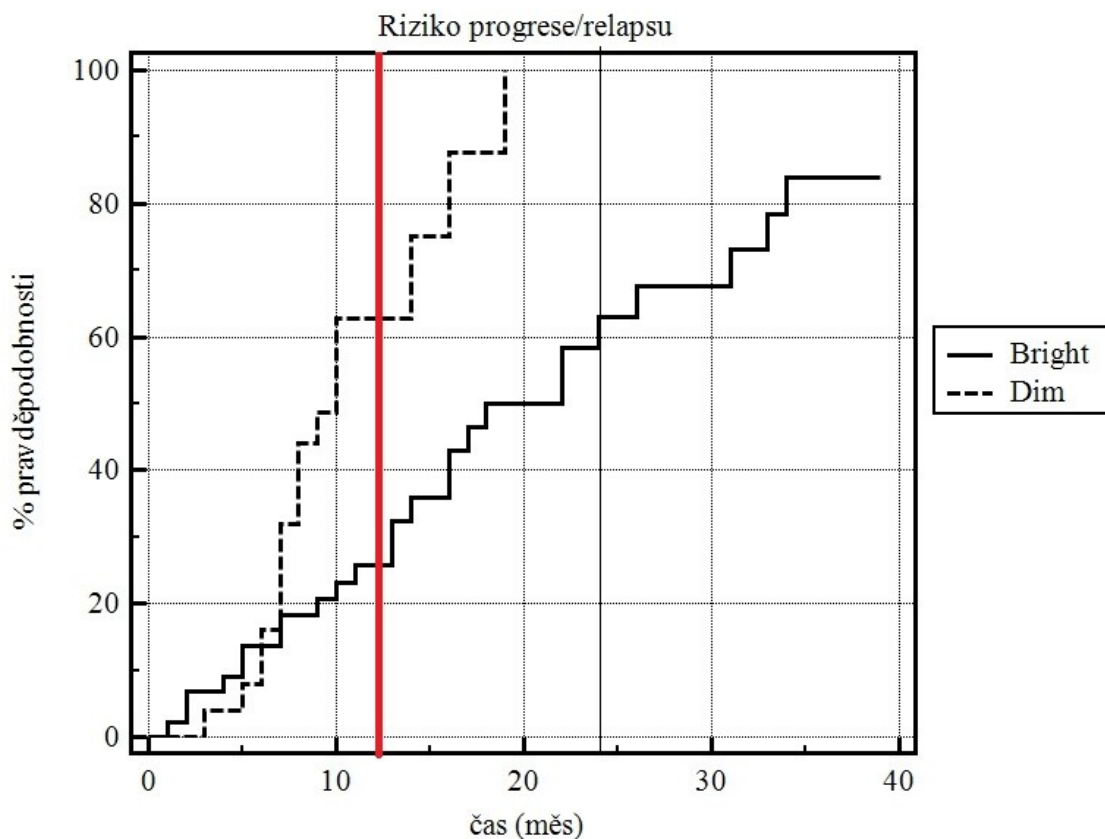
Obrázek 4 - Vyšetření průtokovou cytometrií, exprese CD 45 u plasmocytů **1A** Populace patologických plasmatických buněk s vyšší „*bright*“ expresí znaku CD45 (fialové-plasmatické buňky, zeleně lymfocyty) „*bright*“ skupina. **1B** Populace plasmocytů s nižší „*dim*“ expresí CD 45 znaku – „*dim*“ skupina.

2.5.6. Výsledky

Analyzovaný soubor tvořilo celkem 71 pacientů s ukončenou 1. linií léčby. Byly porovnány skupiny pacientů s nízkou „*dim*“ ($n=25$) a vyšší „*bright*“ ($n=46$) expresí CD 45 antigenu. K 1/2014 žilo 51/71 (72 %) pacientů, 20/71 (28 %) zemřelo, obě skupiny s mediánem doby sledování 18 (8-44) vs. 22 (1-107) měsíců ($p= 0,08$).

Nebyl statisticky významný rozdíl s ohledem na věk – medián 58 (38-67) vs. 62 (40-72) let ($p=0,30$), zastoupení pohlaví - poměr muži/ženy 13/12 vs. 24/22 ($p=1,0$), výskyt nepříznivých genetických aberací 7/25 (28 %) vs. 9/46 (20 %) ($p=0,57$), výskyt 3. stádia dle ISS 14/25 (56 %) vs. 20/46 (44 %) ($p=0,67$), dosažení kompletní remise po 1. linii léčby: 5/20 (20%) vs. 13/39 (29 %) ($p=0,78$), četnost autologní transplantace 23/25 (92 %) vs. 39/46 (85 %) ($p=0,86$) – viz také údaje v tabulce 5.

Při srovnatelném mediánu sledování u obou skupin byla pravděpodobnost progresu ve 12 měsících 62 % ve skupině „*dim*“ vs. 25 % ve skupině „*bright*“ a medián TTP byl 10 vs. 20 měsíců ($p=0,0011$) – viz graf 1.



Graf 1 - Pravděpodobnost progresu nebo relapsu mnohočetného myelomu podle typu exprese znaku CD 45. U skupiny s vyšší „*bright*“ expresí je ve 12 měsících riziko progresu 25 %, u druhé „*dim*“ skupiny je pak riziko progresu/relapsu již 62 % ($p=0,0011$)

2.5.7. Diskuse

Mnohočetný myelom je malignita s velmi variabilním, ale často agresivním průběhem. Míru jeho agresivity a léčebné výsledky lze do určité míry předpokládat s využitím prognostických stratifikací, systémů a markerů, kde mezi nejvýznamnější patří stádium dle ISS (10) a genetické aberace s významnou rizikovostí v podobě komplexních aberací, delece 17p (resp. delece genu TP53), t(4;14) a t(14;16) (3). Poměrně zajímavým a jednoduše detekovatelným markerem prognózy u MM by mohla být exprese antigenu CD 45 na povrchu patologických plasmocytů, jak uvádí Moreau et al. a další (13,16,17), který dává nízkou expresi CD 45 do souvislosti s časnější progresí myelomu. Jelikož znak CD 45 se podílí především na apoptóze a transformaci buněk (14), je tak pravděpodobné, že právě nízká exprese tohoto znaku způsobuje u plasmocytů vyšší odolnost vůči apoptóze a tím i menší odolnost k léčbě. Z toho vyplývá, že pacienti s negativitou CD 45 budou více ohroženi časným relapsem či progresí nemoci bez vlivu na dosažení stavu remise po indukční terapii. Pokud porovnáme citace z dostupné literatury, tak ve většině textů (13,14,16,17) se autoři shodují na vlivu nízké exprese CD na rizikovosti nemoci, ale u některých autorů (14) není statistická signifikance tak výrazná. Jelikož je stanovení pomocí průtokové cytometrie poměrně rychlé a snadné, je nutné o významu vyšetření tohoto markeru uvažovat. Je pravda, že maximální využívání FACS parametrů u jiných hematologických nemocí se dnes již dostává do pozadí (např. znaky CD 38 a ZAP 70 u CLL), které byly dříve velmi vyzdvihovány jako jednoznačné prognostické znaky, se dnes ukazují jako ne úplně vypovídající o rizikovosti nemoci (9). Ale na druhou stranu nutno vzít v potaz, že u mnohočetného myelomu je doba přežívání výrazně kratší než třeba u zmiňované CLL a právě proto je i snaha o co nejsnadnější stratifikaci nemoci důležitá. Za úvahu do budoucna stojí využití

znalosti exprese CD 45 znaku například u udržovací terapie. Při teorii znalosti rizikovosti exprese znaku CD 45 by byly například myelomy s nízkou expresí CD 45 indikovány časně k udržovací terapii již v první linii po autologní transplantaci. Nabízí se i konsolidační terapie po autologní transplantaci u těchto rizikových pacientů. Pro jasný názor však zatím chybí relevantní data. Cílem naší práce bylo porovnat dobu do progresu/relapsu (TTP) u našich pacientů s MM s ohledem na expresi CD 45 znaku a porovnat se souborem dle dostupné literatury. Porovnali jsme početně poměrně dobře zastoupené skupiny pacientů s nízkou a vyšší expresí CD 45. Mezi skupinami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v demografických parametrech, rizikovosti cytogenetiky ani efektu 1. linie léčby. Soubor s nízkou expresí CD 45 měl významně kratší TTP, což odpovídalo i datům původní práce Moreau et al (16). Velmi zajímavé bylo, že v obou skupinách nebyl signifikantní rozdíl v zastoupení negativních cytogenetických nálezů (tzn. nepříznivé nálezy- komplexní aberace karyotypu, delece 17p (resp. delece genu TP53), t(4;14) a t(14;16)), které se obecně u MM považují za jeden z nejdůležitějších prognostických kritérií. V obou skupinách byly zastoupeny jak nepříznivé cytogenetické změny tak normální karyotyp a také příznivé cytogenetické nálezy. Naše výsledky byly tedy podobné jako Moreau et al. a limitací našeho sledování byl především retrospektivní charakter a unicentrická lokalizace. V případě většího zastoupení pacientů a spolupracujících center by výsledky mohly být ještě více validní. Nicméně na druhou stranu je v tomto našem případně zajištěna uniformní metodika a nastavení analýzy průtokové cytometrie.

V závěru, na základě našich nálezů a zkušeností Moreau et al. (16), se domníváme, že exprese CD 45 antigenu by se mohla stát jedním z prognostických faktorů MM. Náš soubor byl homogenní, početný a všechna vyšetření průtokovou cytometrií byla prováděna v jedné laboratoři. Ověření

je však vhodné na větším souboru pacientů – nadále probíhá vyšetřování FACS znaků u dalších pacientů – a ideálně v rámci multicentrické spolupráce, kdy by mohlo být ideální porovnání mezi jednotlivými centry.

2.5.8. Souhrn a závěr

Mnohočetný myelom je jedním z nejčastějších hematologických onemocnění s variabilním agresivním i indolentním chronickým průběhem. Prognostická stratifikace se dále upřesňuje s vývojem nových metodik hlavně v cytogenetice a průtokové cytometrii. Antigen CD 45 by mohl být jedním ze znaků, které mohou upřesnit rizikovost nemoci již při diagnóze. 71 pacientů v našem souboru bylo rozděleno podle intenzity exprese CD 45 antigenu a skupina s nižší expresí měla statisticky vyšší riziko relapsu do 12 měsíců 62 % vs. 25 % ($p=0,0011$). Mezi porovnávanými skupinami nebyl statisticky významný rozdíl s ohledem na věk, zastoupení pohlaví, intenzifikaci s autologní transplantací krvetvorných buněk, dosažení kompletní remise po první linii léčby a genetické nálezy. Na základě našich poznatků se domníváme, že exprese CD 45 antigenu by se mohla stát jedním z prognostických faktorů či jedním z faktorů pro určení udržovací léčby u MM. Ověření je vhodné na větším souboru pacientů, ideálně v rámci multicentrické spolupráce.

2.5.9. Použitá literatura

1. ADAM, Z. *Kostní nádorová choroba*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1357-8.
2. AJAZ, B., AKHTAR, A., CHANG, Ch., SOLH, M., TANGONAN, K., KHALED, Y. *Plasma cell CD20 expression: primary aberrant expression or receptor up-regulation*. *Leukemia & Lymphoma* [online]. 2013, 55(2), 444-446 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.3109/10428194.2013.802782. ISSN 1042-8194.
3. AVET-LOISEAU, H., ATTAL, M., MOREAU, P. et al. *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome*. *Blood*. 2007, 2007(109), 3489-3495.
4. COLLETTE, M., DESCAMPS, G., PELLAT-DECEUNYNCK, C., BATAILLE, R., AMIOT, M. *Crucial role of phosphatase CD 45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells*. *Eur Cytokine Netw*. 2007, **18**(3), 120-6.
5. CZECH Myeloma group. *Mnohočetný myelom, diagnostické testy, doporučené postupy léčby*. *Transfúze a hematologie dnes*. 2009, 2009(15), 5-80.
6. DEWS, M., NISHIMOTO, I., BASEGRA, R. *IGF-I receptor protection from apoptosis in cells lacking the IRS proteins*. *Recept signal transduct* 1997; 7(4): 231-40.

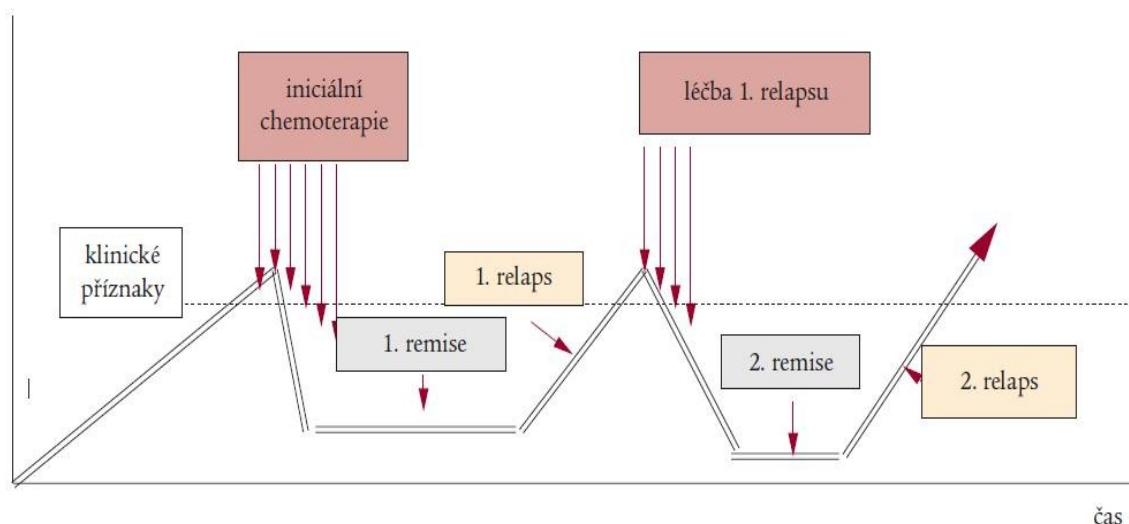
7. ELLEDER, M. *Buněčné klony- fyziologie a patologie* [online]. ÚDMP-1.LFUK,2009.
dostupné na <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/klony/klony.pdf>
8. FIŠEROVÁ, B. *Význam mikroprostředí kostní dřeně v patogenezi mnohočetného myelomu*. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 234–240.
9. GREVER, MR., LUCAS, DM., DEWALD, GW. *Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997*. *J Clin Oncol*. 2007, **25**(7), 799-804.
10. KIM, H., HEE-JUNG, S., SHIN, K. et al. *New staging systems can predict prognosis of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation as first-line therapy*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006, **12**(8), 837–844.
11. KORBET, SM., SCHWARTZ, M. *Multiple myeloma*. *J Amer Soc Nephrol*. 2006, (17), 2533-2545.
12. KOVÁŘOVÁ, L. *Flowcytometrická analýza dendritických buněk osob s monoklonální gamapatií a mnohočetným myelomem*. 2007. *Klinická onkologie* 2008; 21: 249-252.
13. KUMAR, S., KIMLINGER, T., MORICE, W. *Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders*. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010, **23**(3), 433–451.

14. KUMAR, S., RAJKUMAR, SV., KIMLINGER, T., GREIPP, PR., WITZIG, TE. *CD 45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations*. Leukemia. 2005, **19**(8), 1466-70.
15. MATEO, G., CASTELLANOS, M., RASILLO, A., GUTIÉRREZ, NC., MONTALBÁN, MA., MARTÍN, ML., HERNÁNDEZ, JM. *Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma*. Clin Cancer Res. 2005, **11**(10), 3661-7.
16. MOREAU, P., ROBILLARD, N., AVET-LOISEAU, H., et al. *Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma*. Haematologica 2004; **89**(5): 547-51.
17. PELLAT-DECEUNYNCK, C., BATAILLE, R. *Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression*. Blood Cells Mol Dis. 2004, **2004**(32), 293–301.
18. RAAB, MS., PODAR, K., BREITKREUTZ, I., RICHARDSON, PG., ANDERSON, KC. *Multiple myeloma*. Lancet. 2009, 2009(9686), 324-339.
19. TEPLAN, V. *Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíně*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-1121-8.
20. VORLÍČEK, J., ADAM, Z. *Doporučené postupy pro praktické lékaře, mnohočetný myelom.: Doporučení ČSL JEP* [online]. 2002. Dostupné také z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>

3 Léčba mnohočetného myelomu

3.1. Léčba obecně

Léčba myelomu prošla velkým vývojem během posledních 15 let. Do roku 2000 byl standardní postupem indukční režim složený z vinkristinu, adriamycinu a kortikoidu (VAD). Následovala autologní transplantace s případným doplněním udržovací léčby s interferonem. Ve 21. století došlo k velmi výraznému rozvoji moderní léčby MM. Mezi tzv. nové léky patří thalidomid, bortezomib a lenalidomid. Kombinace těchto léků s dalšími (kortikoidy, alkylační cytostatika) se používají ve všech liniích léčby. Došlo tak k velmi výraznému zlepšení výsledků léčby ve smyslu zlepšení kvality života pacientů a došlo i k prodloužení celkového přežívání. Nemoc je přesto v tuto dobu stále považována za nevléčitelnou (s výjimkou šance při zajištění alogenní transplantace krvetvorných buněk), střídají se období remisí a progresí/ relapsů nemoci, přičemž každá následná remise bývá v naprosté většině případů kratší než ta předchozí.



Obrázek 5 průběh nemoci při léčbě myelomu (zdroj: <http://www.linkos.cz/myelom-c90/o-mnohocetne-myelomu>)

3.2. Léčba pacientů do 65 let

U pacientů mladších 65 let nebo do 70 let v dobré klinické kondici volíme indukční režimy, které umožňují následnou mobilizaci CD34+ krvetvorných buněk k následnému zajištění vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk. V dnešní době je standardem indukční léčby protokol VTD - thalidomid 100-200mg/den 1.-28.den, bortezomib 1,3mg/m² s.c. 1x týdně, DXM (dexamethason) 40mg p.o. 1.-4. a 15.-18.den. Tyto cykly se podávají většinou 4 s cílem navození co nejlepší remise onemocnění. Jako alternativní režimy můžeme použít režim VD (bortezomib + DXM), CTD (cyclofosfamid + thalidomid+ DXM), BDD (bortezomib+ doxorubicin + DXM). Všechny tyto režimy jsou následovány mobilizačním protokolem s vysocedávkovaným cyklofosfamidem (CPA) následované minimálně týdenní aplikací G-CSF (růstového faktoru granulopoezy) v dávce 10ug/kg a separací periferních CD34+ buněk pro zajištění výše zmíněné autologní transplantace.

3.3. Léčba pacientů nad 65 let

U pacientů starších 65 let či ve špatném klinickém stavu jsou používány méně intenzivní režimy ve snaze o dosažení remise nemoci bez většího rizika toxicity léčby. Lze použít jak režimy na bázi thalidomidu s nižším dávkováním než u mladších pacientů (CTD senior, MPT) nebo na bázi bortezomibu (VD, VMP senior).

3.4. Autologní transplantace

Jako dosud nejlepší možnost dalšího zlepšení výsledků úvodních protokolů indukční léčby (viz 3.2.výše) je zajištění vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk. Zajištění dvou vysokodávkovaných chemoterapií s autologní transplantací přináší statisticky

signifikantně lepší výsledky celkového přežití (OS) než jakékoliv standardní chemoterapie (9). Toto potvrzují i výsledky 5 randomizovaných klinických studií (francouzská IFM 90, americká US INT, španělská Pethema, anglická MRC 7 a francouzská MAG 91)(16). Principem autologní transplantace je možnost aplikovat pacientovi vysokodávkovanou chemoterapii a současně zajistit následnou reparaci krvetvorby. V rámci přípravy před vysokodávkovanou chemoterapií je pacientovi po úvodní indukční chemoterapii zajištěna mobilizace a separace CD34+ krvetvorných buněk (viz 3.2.výše), následně je podána vysokodávkovaná chemoterapie s melphalanem se silným myeloablativním účinkem, a následně za 24 hodin je pacientovi do krevního oběhu podána autologní transplantace štěpu původně odebraných a dočasně kryokonzervovaných krvetvorných buněk. V následném 7-10 denní období útlumu krvetvorby a pancytopenie, než dojde k reparaci krvetvorby z autologního štěpu, je sice vysoké riziko infekčních komplikací, ale obecně je autologní transplantace bezpečná s transplantační mortalitou ve velkých specializovaných centrech do 1 %.

3.5. Alogenní transplantace

Alogenní transplantace je nadále velmi spornou modalitou v léčbě MM. Stále převažuje vysoká transplantační mortalita (TRM) zřetelně zhoršující výsledky této léčby, která jako jediná přináší možnost plného vyléčení. Podle posledních výsledků EBMT a GIMEMA studií se zdá možnost benefitu alogenní transplantace v případě realizace u vysocerizikových a prognosticky nepříznivých pacientů transplantovaných v 1. až 2. remisi nemoci, ideálně v tandemu autologní a následně alogenní transplantace. (10). Aktuálně je tedy alogenní transplantace využívána jen ve specifických individuálních případech.

3.6. Nové léky v léčbě mnohočetného myelomu

Během posledních let došlo k velkému vývoji dalších možností léčby a postupně se objevují nové molekuly zlepšující výsledky dlouhodobého přežívání. Mezi takové molekuly patří:

3.6.1. Inhibitory proteasomu

Léky inhibující reversibilně proteasom (bortezomib, ixazomib, oprozomib, delanzomib) způsobí předčasnou destrukci buňky urychlením apoptózy při snížené degradaci bílkovin proteasomem. Z ireversibilních inhibitorů je pak nyní dostupný carfilzomib, který má velmi slibné výsledky v indukční léčbě.

3.6.2. Imunomodulační léky

První imunomodulační lék thalidomid snižuje růst myelomových buněk a vlivem změn povrchových molekul na myelomových buňkách včetně antiangiogeneze umožňuje antimyelomový efekt. Jeho nevýhodou jsou poměrně četné nežádoucí účinky (neuropatie, riziko tromboembolické nemoci). Z další generace imunomodulačních léků je lenalidomid, který má výrazně nižší výskyt nežádoucích účinků při vzrůstajícím efektu léčby. Jako poslední v klinické praxi je nyní používán pomalidomid, který má maximum imunomodulačních účinků v této skupině a naopak bývá velmi málo komplikací během léčby.

3.6.3. Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou protilátky produkované jedním klonem B lymfocytů namířené proti specifickému antigenu cílové buňky. První monoklonální protilátkou v této skupině je humánní anti-CD38 daratumumab, která po navázání na antigen CD 38 na plasmatických buňkách iniciuje

imunitní reakci cestou komplementu i cestou tvorby protilátek a navodí tak zničení nádorové buňky. Molekulou další generace těchto monoklonálních protilátek je elotuzumab, který je cílen na povrchový glykoprotein CS1 (anti-CS1) exprimovaný pouze na myelomových a NK buňkách. Všechny tyto protilátky mají podobné spektrum nežádoucích účinků jako jsou alergická reakce, třesavka, horečka.

3.6.4. Inhibitory deacetylázy (HDAC)

Chemické látky inhibující enzymatickou aktivitu histonových deacetyláz a způsobující rozvolnění chromatinu DNA a tím možnost přístupu transkripčních faktorů a rychlejší degradaci buňky. Mezi zástupce této skupiny patří panobinostat, ricolinostat a vorinostat.

3.7. Vlastní výzkum v terapeutické oblasti - porovnání autologní transplantace krvetvorných buněk realizované tandemově nebo v relapsu nemoci u pacientů s mnohočetným myelomem.

Plánováno publikování v zahraničním časopisu (Lymphoma and myeloma, Neoplasma) do konce roku 2016: JUNGOVA, A., VOKURKA, S., SCHÜTZOVA, M., STEINEROVA, K., MOHAMMADOVA, L., KARAS, M., LYSAK, D., JINDRA, P.: *Comparison of the autologous hematopoietic cell transplantation performed in tandem or in disease relapse in patients with multiple myeloma*: Department of Hematology and Oncology, University Hospital in Pilsen.

3.7.1 Úvod

Mnohočetný myelom je maligní hematologické onemocnění, které představuje v evropské populaci kolem 15 % hematologických malignit a až 1% všech nádorových onemocnění. V České Republice onemocní ročně až 600 pacientů, přičemž nejčastější výskyt je ve věku nad 60 let (v tomto věku incidence 1-4 os. /100 000 obyvatel ročně), ale ve věku nad 75 let incidence poměrně prudce vzrůstá (až 16 os. /100 000 obyvatel) (7). Základem indukční léčby je kombinace moderních léků jako jsou thalidomid, bortezomib či lenalidomid v kombinaci s kortikoidy a event. s alkylačními látkami či antracykliny. Zpravidla se podávají 4 cykly indukční chemoterapie následované u transplantabilních pacientů (cca do 65 let, u starších jen při dobrém klinickém stavu) mobilizací periferních krvetvorných buněk (PBSC). Pokud je separace PBSC úspěšná ideálně s odběrem na 2 autologní transplantace, následuje do 3-6 měsíců první autologní Tx. Další strategie je závislá na zvyklostech oddělení a není standardně doporučen postup pro podání double Tx. V ČR je tandemová Tx využívána k dosažení co nejhlubší odpovědi nemoci (doporučení CMG pro léčbu myelomu -8 - odstavec 9.4). Naším cílem bylo ověřit klinický přínos a rozdílnost výsledků v případě

zajištění druhé autologní Tx v rámci tandemového přístupu při dosažení pouze PR a méně po transplantaci první ve srovnání s provedením druhé Tx až při relapsu/progresi choroby. Vedlejším cílem bylo ověřit význam hladiny paraproteinu na dosažených výsledcích léčby.

3.7.2. Metodika

Retrospektivní analýza pacientů s MM s cílem porovnat dobu do zahájení další léčby po poslední autologní Tx (TFS) i celkové přežívání (OS) u dvou skupin pacientů s odlišným schématem provedení druhé autologní transplantace periferních krvetvorných buněk. Do analýzy bylo zařazeno celkem 66 pacientů s MM, kteří byli léčeni na našem oddělení v období let 2005-2014. Všichni pacienti podstoupili 4 cykly indukční chemoterapie, nejčastěji podle protokolu CTD či VAD a také CVD (event. VD) viz tabulka 6. U všech pacientů proběhla úspěšná mobilizace cyklofosfamidem (HD-CPA 2,5 g/m²) s následnou stimulací G-CSF filgrastim (Neupogen, Amgen, dávka 10ug/kg/den) a u všech byl získán štěp periferních krvetvorných buněk dostačující pro zajištění dvou vysocedávkovaných chemoterapií s autologní Tx. Jako přípravný předtransplantační protokol podán melphalan v jednorázové denní dávce 200mg/m² s redukcí dávky na 140mg/m² u pacientů nad 65 let (5) a nebo při renální insuficienci, přičemž protokol byl u každého pacienta vždy identický při obou transplantacích.

V první porovnávané skupině bylo analyzováno 28 pacientů, kteří dosáhli po 1. autologní Tx PR a méně (pouze u 5 pac. (18%) bylo dosaženo VGPR, ale všichni tito pacienti měli nepříznivou cytogenetiku a byla snaha o dosažení co nejhlubší odpovědi nemoci) - u většiny pac. tedy přetrvávala poměrně značně detekovatelná choroba. Plánovaně byla v této skupině v mediánu za 5,5 (2-11)

měsíců doplněna tandemová autologní Tx a v době provedení druhé Tx nebyl nikdo v progresi nemoci.

Ve druhé skupině bylo zařazeno 38 pacientů, kteří byli po provedení první autologní Tx pouze sledováni při dosažení stavu CR a VGPR (66% pac. této skupiny). Zbytek skupiny byl sice v PR, ale u části pac. progresse nastala časně do 6 měsíců po 1.Tx, část pacientů plánovanou Tx odmítla a část nebyla tandemové Tx v plánovanou dobu schopna. K doplnění druhé Tx tedy byli tito pac. indikováni ve fázi relapsu/progrese myelomu a reindukční léčba u nich nebyla realizována. V rámci subanalýzy jsme tuto skupinu rozdělili na 2 podskupiny s ohledem na hodnoty paraproteinu před provedením druhé Tx, kdy hodnotu cutt of pro „nízkou hladinu“ paraproteinu jsme arbitrárně stanovili na 10g/l, event. 1000mg/l v případě MM s produkcí lehkých řetězců imunoglobulinu. Vyšší hodnoty paraproteinu včetně tří pacientů s extramedulárním postižením byly hodnoceny jako „vysoká hladina“.

Porovnáním základních parametrů v obou skupinách (věk, zastoupení pohlaví, ISS skóre nemoci, cytogenetické nálezy, typ indukční terapie) nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl (viz. tabulka 6). Charakteristiky v podskupinách u pacientů transplantovaných v relapsu nemoci podle hladiny vstupního paraproteinu jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 6 - Charakteristiky pacientů v souboru pro porovnání podání autologních transplantací

Počet pacientů:	66		
	Tandem (n=28)	Tx v relapsu (n=38)	
Pohlaví, muži / ženy:	14/14	17/21	p= 0.13
Věk v době diagnózy – medián (min – max):	59 (41-69)	59 (45-69)	p= 0.36

Medián sledování	46.5 (21-165)	33 (20-112)	p= 0.89
Stádium ISS v době dg.:			
1.	8 (29%)	14 (37%)	p= 0.80
2.	9 (32%)	9 (24%)	p= 0.60
3.	11 (39%)	15 (39%)	p= 1.00
Genetika:			
<i>normální karyotyp</i>	2 (7%)	7 (18%)	p= 0.30
<i>t (4;14)</i>	2 (7%)	3 (8%)	p= 0.17
<i>monosomie 13</i>	6 (21%)	7 (18%)	p= 1.00
<i>změny p53</i>	1 (3%)	0 (0%)	p= 0.43
<i>t (11;14), hyperdiploidie</i>	10 (36%)	8 (22%)	p= 0.42
<i>ostatní nebo neprovedené</i>	7 (26%)	13 (34%)	p= 0.61
Indukční chemoterapie:			
<i>CTD</i>	11 (39%)	13 (34%)	p=0.81
<i>CVD, VD</i>	6 (21%)	12 (32%)	p=0.59
<i>VAD</i>	10 (36%)	12 (32%)	p=0.81
<i>RD</i>	1 (4%)	1 (2%)	p=1.00
Stav onemocnění v době po indukci:			
<i>CR</i>	0 (0%)	9 (24%)	p=0.02
<i>VGPR</i>	5 (18%)	16 (42%)	p=0.20
<i>PR</i>	18 (64%)	13 (34%)	p=0.19
<i>SD</i>	5 (18%)	0 (0%)	p=0.02
Stav onemocnění v době po 1.autologní			
Tx:	2 (7%)	16 (42%)	p=0.01
<i>CR</i>	7 (25%)	11 (29%)	p=1.00
<i>VGPR</i>	19 (68%)	11 (29%)	p=0.08
<i>PR</i>			

Tabulka 7 - Charakteristika v podskupinách u pacientů transplantovaných v relapsu nemoci podle hladiny vstupního paraproteinu v době 2. autologní transplantace .

Počet pacientů:	38		
	Nízká hladina paraproteinu (n=20)	Vysoká hladina paraproteinu (n=18)	
Pohlaví, muži / ženy:	8/12	9/9	p= 0.77
Stádium ISS:			
1.	8 (40%)	5 (28%)	p= 0.75
2.	3 (15%)	5 (28%)	p= 0.69
3.	9 (45%)	8 (44%)	p= 1.00
Genetika:			
<i>normální karyotyp</i>	4 (20%)	3 (17%)	p= 1.00
<i>t (4;14)</i>	1 (5%)	2 (11%)	p= 0.60
<i>monosomie 13</i>	5 (25%)	2 (11%)	p= 0.44
<i>změny p53</i>	0	0	
<i>t (11;14), hyperdiploidie</i>	5 (25%)	3 (17%)	p= 0.71
<i>ostatní nebo neprovedené</i>	5 (25%)	8 (44%)	p= 0.52
Indukční chemoterapie:			
<i>CTD</i>	10 (50%)	3 (17%)	p=0.19
<i>CVD, VD</i>	4 (20%)	8 (44%)	p=0.33
<i>VAD</i>	6 (30%)	6 (33%)	p=1.00
<i>RD</i>	0	1 (6%)	p=0.49

Doba TFS byla definována jako počet měsíců od doby podání 2. autologní Tx do doby zahájení další léčebné linie pro relaps/progresi nemoci. Doba OS byla standardně definována od doby diagnózy do doby posledního sledování nebo úmrtí.

3.7.3. Statistické zpracování

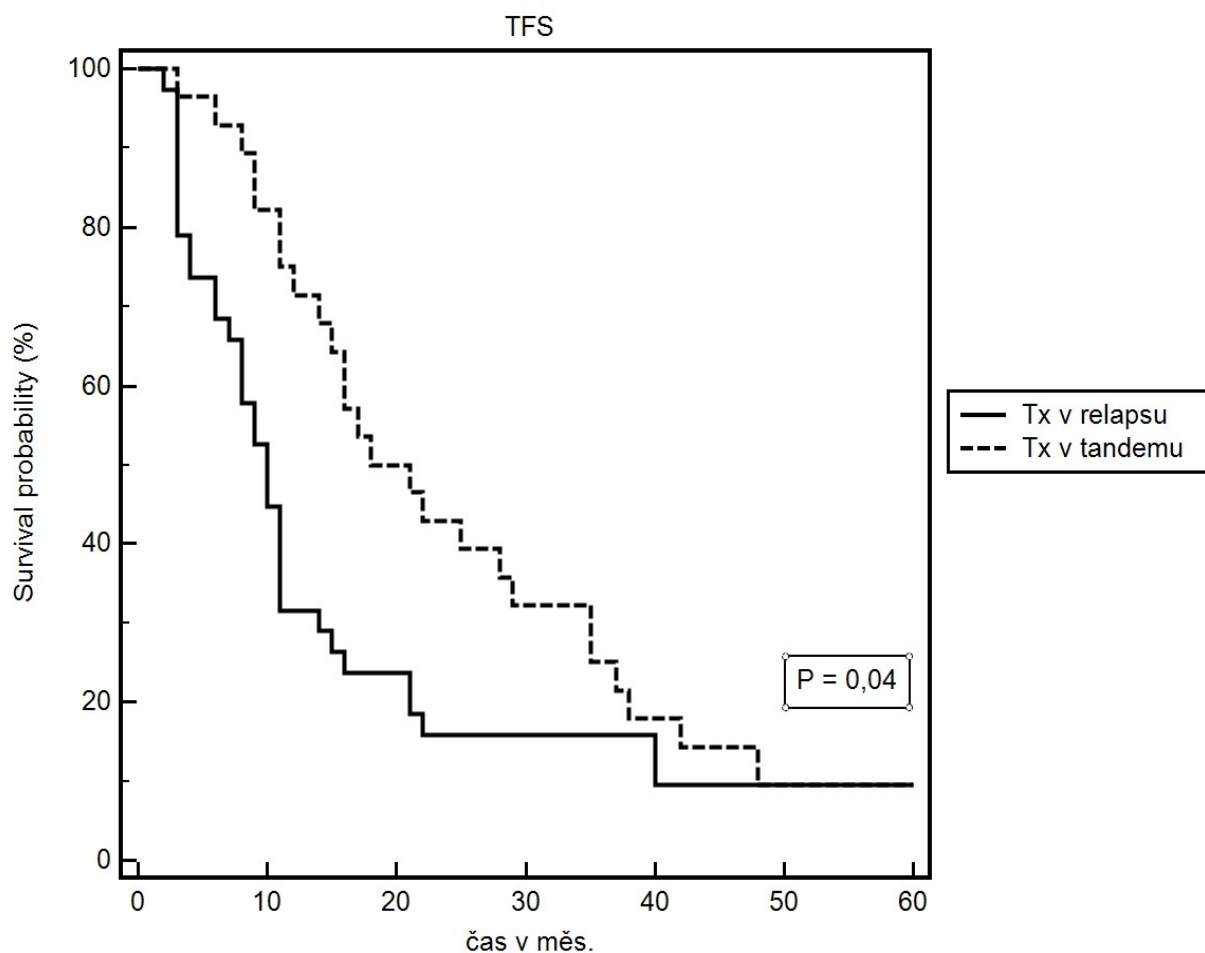
Provedeno s využitím programu GraphPad InStat - Statistica Software a základních statistických testů - Mann-Whitney, Fisher's Exact Test a t-test. Křivky pravděpodobnosti progrese a TFS byly zpracovány Kaplan-Meier metodikou a vyhodnocení významnosti statistických rozdílů bylo provedeno log-rank testem (software MedCalc) Rozdíly mezi skupinami byly testovány na hladině významnosti 95% a hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za staticky významné rozdíly.

3.7.4. Výsledky

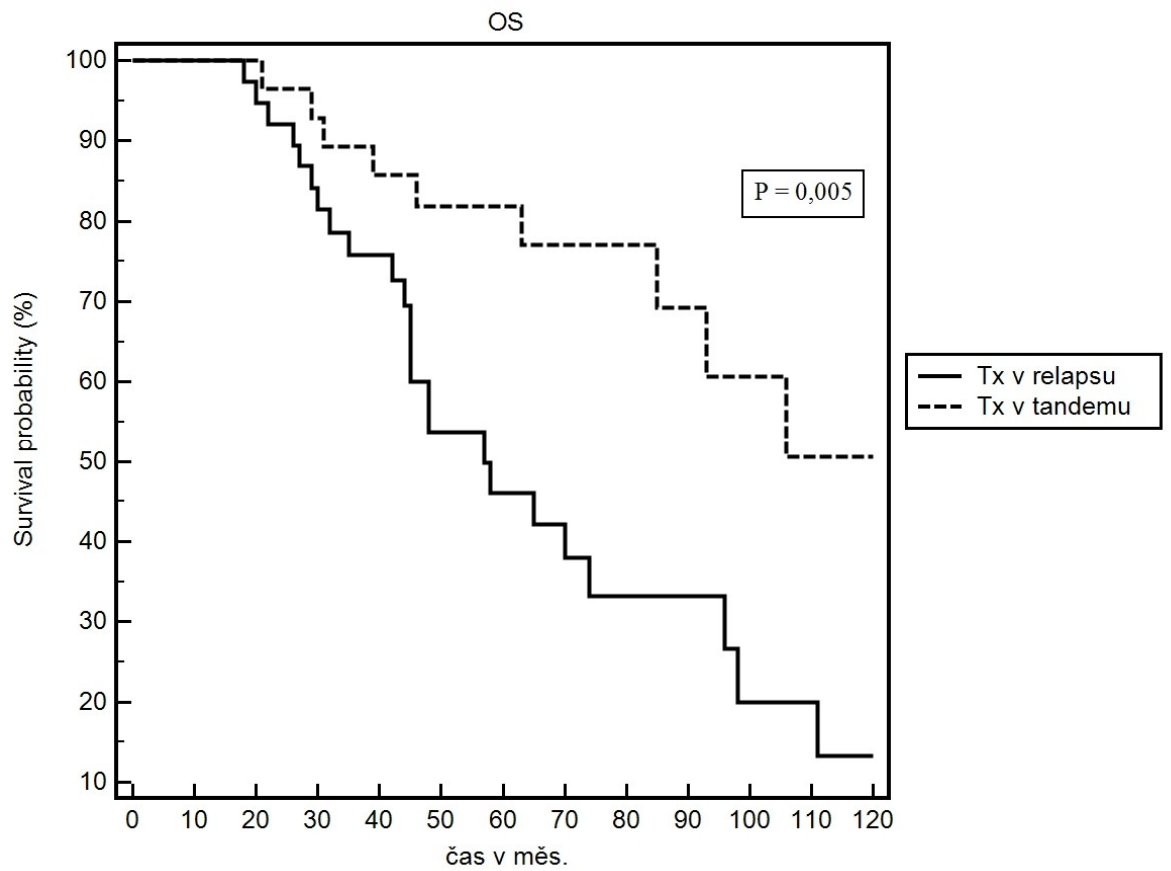
Porovnáním skupiny pacientů s tandemově zajištěnou druhou autologní Tx oproti skupině s druhou autologní Tx v relapsu/progres nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v základních charakteristikách – věk, zastoupení pohlaví, stádium nemoci 3 dle ISS, cytogenetický profil – a nebyl patrný ani rozdíl v mediánu sledování pacientů: 46,5 měsíce (21-165) vs. 33 měs.(20-112) $p=0.36$. K 10/2015 žije 34/66 pac. (52%), zemřelo 32 pac. (48%). Bližší údaje jsou uvedeny v tabulce 6.

Medián doby do zahájení další léčebné linie TFS byla významně kratší u pacientů podruhé transplantovaných v relapsu nemoci: 10 měs. (3-199) vs. 18 měs. (3-108) ($p=0.04$) (viz graf 2) a současně zde bylo patrné i statisticky signifikantně horší celkové přežívání (OS): 57 měs. (18-199) vs. medián tím nedosažen u skupiny tandemově transplantované, $p=0.005$.(viz graf 3).

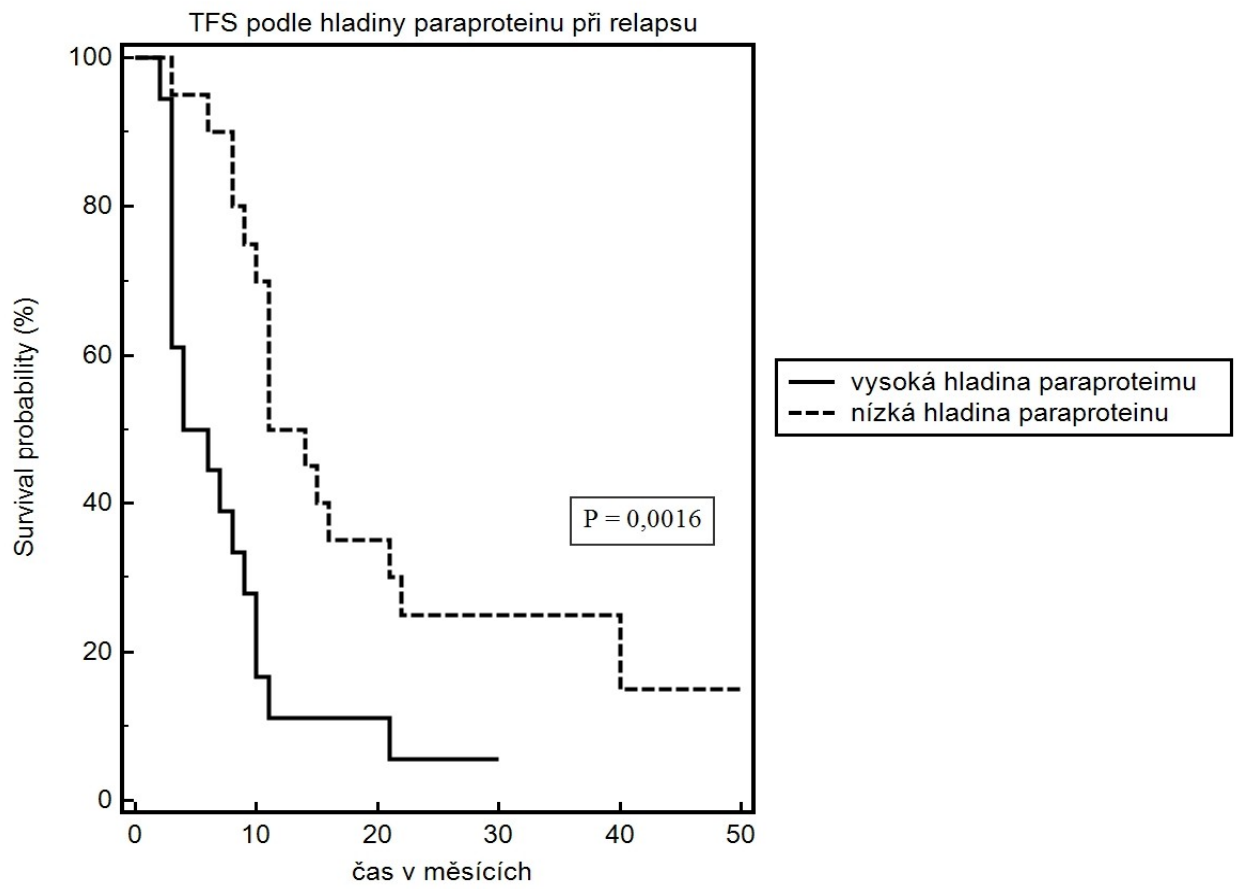
Při subanalýze skupiny transplantované v relapsu nemoci (n=38) s ohledem na hladiny paraproteinu („nízká hladina“ vs. „vysoká hladina“) byl patrný vliv hodnoty paraproteinu tedy i pokročilosti nemoci na TFS a OS, kdy mediány v případě obou charakteristik byly významně kratší u podskupiny s vysokou vstupní hodnotou: 4 měs. (2-30) vs. 11 měs. (3-199), $p=0.0016$ a 44 měs. (18-96) vs. 65 měs. (27-199), $p=0.03$. (blíže viz grafy 4 a 5)



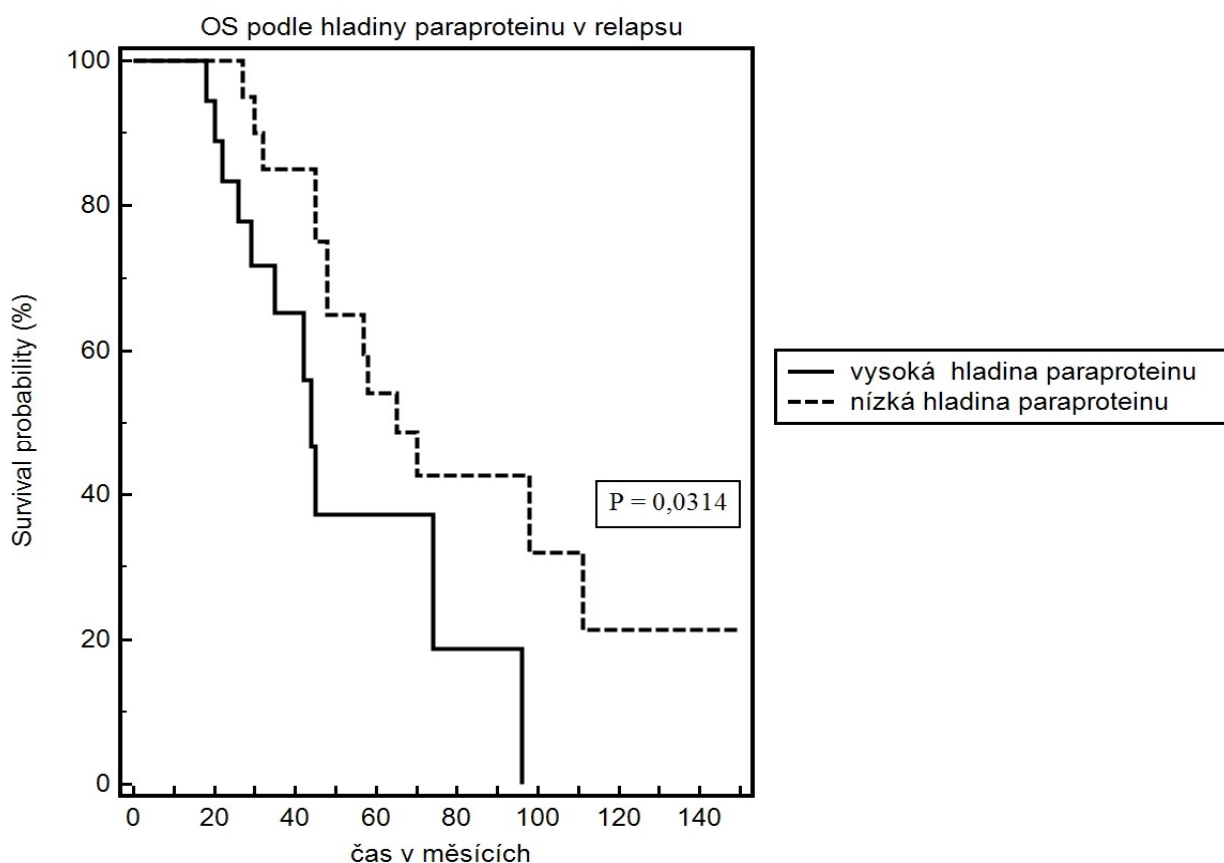
Graf 2 - Porovnání TFS mezi skupinami transplantovanými v tandemu mimo progresi nemoci nebo až při relapsu/progresi choroby ($p=0.04$).



Graf 3 - Porovnání OS mezi skupinami transplantovanými v tandemu mimo relaps nemoci nebo až při relapsu/progresi choroby (p=0.005)



Graf 4 - TFS v závislosti na hladině paraproteinu v době 2. autologní Tx (p=0.0016)



Graf 5 - OS v závislosti na hladině paraproteinu v době 2. autologní Tx

3.7.5 Diskuse

Mnohočetný myelom je agresivní nevléčitelné hematoonkologické onemocnění. Základním postupem je podání indukční léčby následované vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací krevetvorných buněk v 1. linii (11,13). V nejnovějších doporučeních by měla být léčba následně doplněna o konsolidaci (15) a event. udržovací terapii (3,6), ale zatím toto není v našich podmínkách standardním postupem především z důvodů úhradových politik. Použití jedné nebo dvou autologních Tx zatím není standardizováno, nicméně bylo řešeno již v několika klinických studiích (IFM 94, MAG 95, Bologna, GMMG, HOVON) (14). Z největší studie IFM 94 se potvrzuje efekt tandemové transplantace u pacientů, kteří nedosáhli po první Tx alespoň stavu VGPR a lepší odpovědi (6,12). Dle standardních

postupů našeho oddělení k podání druhé Tx přistupujeme buď až v době relapsu/progrese nemoci u pacientů, kteří dosáhnou po 1. autologní Tx CR nebo VGPR a nebo již plánovaně včas a v tandemovém režimu u pacientů, kteří po první Tx dosáhnou pouze stavu PR a horší odpovědi a jsou v dobré klinické kondici. V tomto sdělení uvádíme výsledky analýzy porovnávající tyto dva odlišné přístupy v indikaci druhé autologní Tx.

V celkovém souboru 66 pacientů byly statisticky významně lepší výsledky u skupiny s tandemově zajištěnou autologní Tx a to jak ve smyslu TFS, tak i OS (viz graf 2 a 3): 10 vs. 18 měsíců a 57 měsíců vs. medián ještě nedosažen u při tandemové Tx. Všechny ostatní parametry (věk, cytogenetika, vstupní indukce) nebyly v obou skupinách statisticky rozdílné (viz tabulka 6) a skupiny jsou tak porovnatelné. Dokonce není v našem souboru ani patrný vliv indukční léčby s bortezomibem na TFS a OS (1). Vzhledem k dosažení pouze PR a méně po první Tx u této skupiny je pravděpodobné, že by k relapsu nemoci došlo v poměrně brzké době. Tandemovou Tx jsme tedy provedli u pacientů, kteří dosáhli po 1. Tx pouze SD (5pac.), PR (18 pac.) a jen u 5 pac. s VGPR, ale tito pacienti měli všichni nepříznivý cytogenetický nálezn (del 17p, monosomie 13).

Standardně je doporučováno u prudkých relapsů/progresí provést autologní Tx bez reindukce (8), u pomalejších progresí naopak je reindukce vhodná. V našem souboru jsme porovnali pacienty podle pokročilosti a agresivity progrese, a pacienti s prudkým relapsem (více než 10g/l či více než 1000ug/l lehkých řetězců nebo extraoseální postižení) měli výrazně horší výsledky jak v parametru TFS, tak i OS. Doba do zahájení další léčby po Tx byla u prudce zrelabovaných v mediánu 4 měs., naopak u pomalu progredujících pak 11 měs. a v parametru celkového přežívání pak 44 měs. proti 65 měs. Je samozřejmě pravděpodobnější, že prudký relaps bude spíše nepříznivým faktorem nemoci, ale jelikož mají obě skupiny porovnatelné parametry (věk,

indukční režim, cytogenetický nález), tak se takto nelze jednoznačně vyjádřit. Navíc část prudkých relapsů byla z CR, což by měl být spíše příznivý faktor pro OS, otázka prognózy CR s následným relapsem je tedy diskutabilní (negativní- prudký relaps/pozitivní – dosažení CR).

Delší TFS u skupiny s tandemovým, plánovaným podáním si vysvětlujeme prohloubením remise po 1. autologní Tx při neideální odpovědi po indukci. Vliv nelze přisoudit typu indukční léčby ani cytogenetickým nálezům, protože v porovnání s druhou skupinou jsou tyto parametry naprosto srovnatelné. V mezidobí obou skupin nebyla podávána žádná léčba, protože na našem oddělení se reindukce standardně nepodávala.

Delší OS u tandemové skupiny určitě souvisí s udávaným TFS, protože v této skupině mělo 21 pac. (75%) TFS nad 1 rok a dokonce 14 pac. (50%) TFS přes 2 roky, zatímco ve druhé skupině bylo bez léčby do 1 roku jen 12 pac. (32%) nad 2 roky 7 pac. (18%). Z toho tedy vyplývá, že u skupiny v relapsu bylo nutné zahájení další linie léčby dříve a tím se tedy i zkrátila doba remise i doba do dalšího relapsu. Délka OS nebyla ovlivněna použitím jiných léčebných režimů než ve druhé skupině, protože léčebné protokoly byly stejné v obou skupinách.

Cílem naší práce bylo přispět k vyjasnění strategie 2 autologních Tx u pacientů s mnohočetným myelomem.

Limitací naší analýzy je unicentrické a retrospektivní sledování se selekční bias. Na druhé straně lze za výhodu pokládat stabilitu strategie v léčebném postupu v celém souboru. Plánujeme dále provést ještě analýzu léčebných výsledků u pacientů, kteří by podstoupili reindukční léčbu v případě progresu/relapsu před druhou autologní Tx s cílem ověřit zda reindukce má vliv na prodloužení délky remise a event. celkové přežívání.

3.7.6. Souhrn a závěr

Mnohočetný myelom je maligní hematologické onemocnění, které v České republice postihne až 600 lidí ročně. Stále se zlepšují léčebné možnosti, a autologní transplantace krvetvorných buněk (Tx) nadále zůstává součástí terapeutických protokolů. I přes podávání moderních léků má autologní Tx stále nezastupitelné místo a při zajištění dvou autologních Tx je studii potvrzena více než dvojnásobná doba přežívání oproti pacientům netransplantovaným (2,4). V žádných standardních postupech však není doba mezi provedením transplantací přesněji vymezena. V našem souboru jsme porovnali celkem 66 pacientů, u kterých byly provedeny dvě Tx. Jedna skupina podstoupila obě autologní Tx plánovaně- tandemově v mediánu do šesti měsíců, většinou při dosažení pouze PR a méně po první transplantaci a mimo progresi nemoci. Druhá skupina pacientů podstoupila druhou Tx v mediánu do 14 měsíců až v době progrese nebo relapsu nemoci. Obě skupiny byly v základních parametrech porovnatelné (věk, typ indukční léčby, cytogenetické riziko). Signifikantně lepší TFS (treatment free survival) a celkové přežívání (OS) bylo ve skupině s tandemovým podáním Tx. TFS u pacientů transplantovaných tandemově 18 měs. vs. 10 měs. ($p=0.04$) a medián OS nebyl u této skupiny dosažen vs. 57 měs. ($p=0.005$). Při bližším vyhodnocení skupiny transplantované podruhé až v relapsu je patrná i závislost na vstupní hladině paraproteinu před druhou autologní Tx – TFS u podskupiny s vysokou vstupní hodnotou 4 měs. vs. 11 měs. ($p=0.0016$) a OS 44 měs. vs. 65 měs. ($p=0.03$).

Podle našich výsledků s ohledem na subanalýzu vlivu hladin paraproteinu v době relapsu/progrese před druhou autologní Tx se domníváme, že v případě pokročilejších relapsů/progresí by mohlo být vhodnější zajistit nejprve reindukční léčbu a teprve poté doplnit vysokodávkovanou chemoterapii s autologní Tx. Domníváme se, že u pacientů s větší zbytkovou

nemocí po první Tx (tedy ve stavu pouze PR nebo SD) by bylo výhodné plánovaně v tandemovém režimu doplnit druhou autologní Tx bez odkladu do doby případné další progresse nemoci.

3.7.7. Použitá literatura

1. AVET-LOISEAU, H., LELEU, X., ROUSSEL, M. et al. *Bortezomib Plus Dexamethasone Induction Improves Outcome of Patients With t(4;14) Myeloma but Not Outcome of Patients With del(17p)*. Journal of Clinical Oncology [online]. 2010, **28**(30), 4630-4634 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.3945. ISSN 0732-183x. Dostupné z: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2010.28.3945>
2. ATTAL, M., HAROUSSEAU, JL., FACON, T. et al. *Single versus Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma*. New England Journal of Medicine [online]. 2003, **349**(26), 2495-2502 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1056/NEJMoa032290. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa032290>
3. ATTAL, M., HAROUSSEAU, JL., LEYVRAZ, S. et al. *Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma*. Blood [online]. 2006, **108**(10), 3289-3294 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1182/blood-2006-05-022962. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-05-022962>.
4. ATTAL, M., HAROUSSEAU, JL., STOPPA, AM. et al. *A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma*. New England Journal of Medicine [online]. 1996, **335**(2), 91-97 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1056/NEJM199607113350204. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199607113350204>.

5. BADROS, A., BARLOGIE, B., SIEGEL, E. et al. *Autologous stem cell transplantation in elderly multiple myeloma patients over the age of 70 years*. British Journal of Haematology [online]. 2001, **114**(3), 600-607 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02976.x. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2001.02976.x>
6. CAVO, M., TOSI P., ZAMAGNI, E. et al. *Prospective, Randomized Study of Single Compared With Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma: Bologna 96 Clinical Study*. Journal of Clinical Oncology [online]. 2007, **25**(17), 2434-2441 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1200/JCO.2006.10.2509. ISSN 0732-183x. Dostupné z: <http://www.jco.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2006.10.2509>.
7. CMG - Czech myeloma group [online]. *Základní data a statistika o mnohočetném myelomu*. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom-zakladni-udaje--statistika>
8. CZECH Myeloma group. *Mnohočetný myelom, diagnostické testy, doporučené postupy léčby*. Transfúze a hematologie dnes. 2009, 2009(15), 5-80.
9. GAY, F., CERRATO CH., HAJEK, R. *Impact of Autologous Transplantation Vs. Chemotherapy Plus Lenalidomide in Newly Diagnosed Myeloma According to Patient Prognosis: Results of a Pooled Analysis of 2 Phase III Trials*. In: 56th ASH Annual Meeting and exposition [online]. San Francisco, CA, 2014 [cit. 2014]. Dostupné z: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper68373.html>

10. GARBAN, F. *Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma.* Blood [online]. 2006, **107**(9), 3474-3480 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3869. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-09-3869>.
11. GOLDSCHMID, H. *Single vs double high-dose therapy in multiple myeloma: second analysis of the GMMG-HD2 Trial.* Haematologica. 2005, (90), 38 PL 8.02.
12. HAROUSSEAU, JL. *Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1, or 2).* Curr Opin Oncol. 2005, **17**(2), 93-8.
13. CHILD, JA., MORGAN GJ., DAVIES, FE., et al. *High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Multiple Myeloma.* New England Journal of Medicine [online]. 2003, **348**(19), 1875-1883 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1056/NEJMoa022340. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa022340>.
14. KREJČÍ, M., ADAM, Z., HÁJEK, R. *Significant improvement of longterm survival after autologous transplantation in multiple myeloma patients: a single centre experience.* Bone Marrow Transplant: Supl.1. 2008, **41**, Abstract R1358.
15. LADETTO, M., PAGLIANO, G., FERRERO, S. et al. *Major Tumor Shrinking and Persistent Molecular Remissions After Consolidation With*

Bortezomib, Thalidomide, and Dexamethasone in Patients With Autografted Myeloma. Journal of Clinical Oncology [online]. 2010, **28**(12), 2077-2084 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.7172. ISSN 0732-183x.

Dostupné z: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2009.23.71724>.

16. POUR, L., HÁJEK, R., ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. *Význam autologní transplantace u mnohočetného myelomu.* Vnitřní lékařství. 2009, **55**(9), 767-772.

Příloha 1: Publikační činnost doktorandky

Články:

1. JINDRA, P., RAIDA, L., LYSÁK, D., KARAS, M., PAPAJÍK, T., JUNGOVÁ, A., MOHAMMADOVÁ, L., HOUDOVÁ, L. *Prognostic factors to predict outcome of reduced intensity allogeneic haematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia.* Neoplasma. 2016, **63**(4), 595-600.
2. VOKURKA, S., JUNGOVÁ, A., JINDRA, P. et al. *Udržovací léčba s rituximabem u starších pacientů s Mantle cell lymfomem v první remisi - zkušenost centra.* Transfuze a hematologie dnes. 2015, **21**(4), 206-213. ISSN 1213-5763.
3. JUNGOVÁ, A., VOKURKA, S., HOLUBOVÁ, M., DVOŘÁK, P. *Hodnocení exprese antigenu CD45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresu nebo relapsu.* Transfuze a hematologie dnes. 2014, **20**(2), 53-57.
4. VOKURKA, S., CHVOJKOVA, I., SVOBODA, T., BRANDEJSOVA, R., JUNGOVA, A., BYSTRICKA, E., JINDRA, P. *The impact of oral cryotherapy and oral and gastrointestinal mucositis after autologous stem cell transplantation.* European Journal of Oncology Nursing [online]. 2014, **18**(2), 228-229 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1016/j.ejon.2013.11.001. ISSN 14623889. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1462388913001531>
5. LYSÁK, D., HRABĚTOVÁ, M., VRZALOVÁ, J., KOZA, V., NAVRÁTILOVÁ, J., SVOBODA, T., JUNGOVÁ, A., TOPOLČAN, O. *Changes of cytokine levels during granulocyte-colony-stimulating factor stem cell mobilization in healthy donors: association with mobilization efficiency and potential predictive significance.* Transfusion [online]. 2011, **51**(2), 319-327 [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02863.x. ISSN 00411132. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2010.02863.x>
6. VOKURKA, S., KOZA, V., JINDRA, V., JUNGOVÁ, A. et al. *Alogenní transplantace krvetvorných buněk u pacientů s mnohočetným*

- myelomem - zkušenosti centra*. Transfuze a hematologie dnes. 2009, **15**(4), 244-250. ISSN 1213-5763.
7. DOUBEK, M., JUNGOVÁ, A., MAYER, J. *Alemtuzumab v terapii chronické lymfatické leukemie (CLL) - retrospektivní multicentrická analýza a léčebná odpověď podle cytogenetického rizika: XV. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, Špindlerův Mlýn, 6.-9.9.2008*. Transfuze a hematologie dnes: Suppl. 2. 2008, **14**(2), 1805-4587. ISSN 1213-5763.
 8. JINDRA, P., ŽÁK, P., MUŽÍK, J., JUNGOVÁ, A. *Alogenní transplantace u pacientů s AML starších 50 let mají srovnatelné výsledky s příbuzným i nepříbuzným dárce: finalní analýza multicentrického podprojektu: ALERT*. Transfuze a hematologie dnes. 2010, **16**(2), 1805-4587. ISSN 1213-5763.
 9. VOKURKA, S., SVOBODA, T., KARAS, M., JUNGOVA, A. *Oral cryotherapy can significantly reduce oral mucositis but not acute GVHD incidence in Flu/Mel conditioning allo-SCT*. Bone Marrow Transplantation. 2012, **2012**(47), 739–741. DOI: 10.1038/bmt.2011.156. ISSN 0268-3369.
 10. VOKURKA, S., KOZA, V., JUNGOVA, A., NAVRATILOVA, J. *Haematological malignancies in sibling and unrelated donors of allogeneic peripheral stem cells mobilised with G-CSF filgrastim: a transplant centre and Czech National Marrow Donors Registry experience*. Bone Marrow Transplantation. 2012, **2012**(47), 867–868. DOI: 10.1038/bmt.2011.173. ISSN 0268-3369.
 11. LYSÁK, D., HRABĚTOVÁ, M., JUNGOVÁ, A., SVOBODA, T. *Odběry dárcovských lymfocytů od nepříbuzných dárců Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) v letech 1999 – 2010*. Transfuze Hematol. dnes. 2011, **17**(4), 165-170.
 12. VOKURKA, S., KOZA, V., JUNGOVA, A., NAVRATILOVA, J. *Haematological malignancies in sibling and unrelated donors of allogeneic peripheral stem cells mobilised with G-CSF filgrastim: a transplant centre and Czech National Marrow Donors Registry experience*. Bone Marrow Transplant. 2012, **47**(6), 867-8. DOI: 10.1038/bmt.2011.173.

13. NEUWIRTOVÁ, R., JONÁŠOVÁ, A., ČERMÁK, J., VONDRÁKOVÁ, J., JUNGOVÁ, A. *Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) s delecí dlouhého ramene 5. chromozomu (del(5q), sledovaných Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy.* Transfuze a hematologie dnes. 2009, **15**(4), 204-209. ISSN 1213-5763.
14. NEUWIRTOVA, R., JONASOVA, A., CERMAK, J. et al. *The questions on megakaryopoiesis in MDS patients with del(5q).* Leukemia Research [online]. 2009, **33**, S105- [cit. 2016-03-19]. DOI: 10.1016/S0145-2126(09)70161-4. ISSN 01452126. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212609701614>.
15. LYSÁK, D., VOZOBULOVA, V., JUNGOVA, A., SVOBODA, T. *Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) for chronic lymphocytic leukemia.* Vnitřní lékařství. 2008, **54**(5), 1801-7592. ISSN 0042-773X.
16. SVOBODA, T., KARAS, M., KOZA, V., VOKURKA, S., JUNGOVÁ, A. *Název Primoléčba arsentrioxidem v případech komplikované APL - zkušenosti centra.* Transfuze a hematologie dnes. 2010, **16**(2), 90. ISSN 1213-5763.