

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni



**Klinicko-patologický korelát komplikací intenzivně léčených
hemato-onkologických pacientů s cíleným zaměřením na postižení
dutiny ústní a případ raritní sekundární neoplázie**

MUDr. Samuel Vokurka

Autoreferát doktorandské dizertační práce

Plzeň 2008

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Obor: patologie



**Klinicko-patologický korelát komplikací intenzivně léčených
hemato-onkologických pacientů s cíleným zaměřením na postižení
dutiny ústní a případ raritní sekundární neoplázie**

MUDr. Samuel Vokurka

(Hematologicko-onkologické odd., Fakultní nemocnice v Plzni)

Autoreferát doktorandské dizertační práce

Plzeň 2008

**Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského
studijního programu Šiklova patologicko-anatomického ústavu Lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Plzni**

Uchazeč: MUDr. Samuel Vokurka
Hematologicko-onkologické odd.,
Fakultní nemocnice v Plzni,
Alej Svobody 80,
Plzeň

Školitel: Doc.MUDr.Ludmila Boudová, Ph.D.
Šiklův patologicko-anatomický ústav,
Lékařská fakulta v Plzni,
Univerzita Karlova v Praze

Oponenti:

Doc. MUDr. Edgar Faber, CSc., Hematologicko-onkologická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, Fakultní nemocnice, I. P. Pavlova 6, Olomouc.

Doc.MUDr.Alena Chlumská, CSc, Šiklův patologicko-anatomický ústav Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Ulice Dr.E.Beneše 13, Plzeň.

Stanovisko k dizertační práci vypracoval vedoucí školícího pracoviště: prof. MUDr. Michal Michal, Šiklův patologicko-anatomický ústav v Plzni.

Autoreferát byl rozeslán dne:.....

Obhajoba dizertační práce se koná na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu, Dr.E.Beneše 13, Plzeň, před komisí pro obhajoby dizertačních prací v oboru patologie dne: 11.2.2009.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Histopatologická část této dizertační práce byla z části podpořena grantem IGA NR 9453-3/2007.

- Obsah -

1. Předmluva	5
2. Postižení sliznice dutiny ústní v rámci toxické mukozitidy a reakce štěpu proti hostiteli u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s užším zaměřením na protokol předtransplantační přípravy FLU/MEL.	6
2.1. Přehled o současném stavu problematiky	6
2.1.1. Mukozitida dutiny ústní (MDU)	6
2.1.1.1. Úvod a definice pojmu	6
2.1.1.2. Patofyziologie MDU	6
2.1.1.3. Klinický obraz a souvislosti při MDU	6
2.1.1.4. Výskyt MDU	7
2.1.1.5. Rizikové faktory MDU	7
2.1.2. Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) v dutině ústní	8
2.1.2.1. Úvod a definice pojmu GVHD	8
2.1.2.2. Patofyziologie GVHD	8
2.1.2.3. Klasifikace GVHD	8
2.1.2.4. Klinický obraz GVHD dutiny ústní	8
2.1.2.5. Histologický nález při GVHD v dutině ústní	8
2.1.2.5. Výskyt GVHD	9
2.1.3. Přípravné režimy alogenních transplantací krvetvorných buněk	9
2.1.3.1. Konvenční a redukované režimy	9
2.1.3.2. Přípravný režim FLU/MEL	9
2.2. Cíl práce	10
2.3. Metodika zpracování	10
2.3.1. Soubor pacientů a léčba	10
2.3.2. Předtransplantační příprava	10
2.3.3. Péče o dutinu ústní	10
2.3.4. GVHD profylaxe	11
2.3.5. Antimikrobiální profylaxe	11
2.3.6. Další podpůrná léčba	11
2.3.7. Monitorace, hodnocení a definice	12
2.3.8. Odběr histologických vzorků	12
2.3.9. Statistické zpracování	12
2.4. Výsledky	13
2.4.1. MDU v rámci celého souboru	13
2.4.2. MDU v rámci FLU/MEL vs. Bu/CY2	14
2.4.3. Statistická analýza potenciálních rizikových faktorů MDU	17
2.4.4. Akutní GVHD a postižení dutiny ústní u FLU/MEL	17
2.4.5. Chronická GVHD a postižení dutiny ústní u FLU/MEL	17
2.4.6. Vztah MDU a GVHD	18
2.4.7. Histologické nálezy	19
2.5. Diskuze	20
2.6. Závěry	25
2.7. Seznam použité literatury	26
2.8. Summary	31
3. Kaposiho sarkom po alogenní transplantaci periferních krvetvorných buněk – raritní sekundární neoplázie.	33
3.1. Přehled o současném stavu problematiky	33
3.2. Cíl práce	33
3.3. Metodika zpracování	33
3.4. Výsledky	34
3.5. Diskuze	35
3.6. Závěry	36
3.7. Seznam použité literatury	36
3.8. Summary	37
4. Přílohy – vzdělávací a vědecké aktivity autora ve vztahu k tématu dizertace	38

1. Předmluva

Základní a nenahraditelnou doménou spolupráce klinické hemato-onkologie a patologie je nesporně diagnostika malignit. Bez povšimnutí by však neměly zůstat ani situace, při kterých se klinik obrací na patologa s žádostí o ověření některých stavů, které mohou jako komplikace doprovázet intenzivní léčbu hemato-onkologických pacientů.

Léčba hematologických malignit představuje zásadní zátěž pro pacienta, obzvláště jedná-li se o vysokodávkovanou chemoterapií zajištěnou autologní transplantací krvetvorných buněk nebo přímo o transplantaci alogenní. Ve většině těchto případů jsou pacientům podávána cytostatika v dávkách, které kromě případné specifické orgánové toxicity navozují těžký útlum krvetvorby, poškození sliznic v oblasti zažívacího traktu a imunodeficienci s vysokým rizikem infekcí. V budoucnu jsou pak pacienti po intenzivní chemoterapii ohroženi rovněž vyšším rizikem sekundárních malignit. V případě alogenní transplantace krvetvorných buněk je pak specifickou problematikou také reakce štěpu proti hostiteli (GVHD).

Tato práce se zabývá problematikou poškození sliznic dutiny ústní při toxické mukozitidě a při reakci štěpu proti hostiteli z pohledu klinika a patologa. Součástí práce je i popis případu vzácného rozvoje Kaposiho sarkomu jako sekundární neoplázie po alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Rád bych zároveň poděkoval všem, kdo mi pomohli realizovat postgraduální doktorandské studium a tuto dizertační práci:

prof. MUDr. Michal Michal, prof. MUDr. Alena Skálová CSc., Doc. MUDr. Ludmila Boudová Ph.D., prim. MUDr. Vladimír Koza, prim. MUDr. Petr Mukenšnabl, MUDr. Kateřina Steinerová, Jana Škardová, Doc. MUDr. Dmitry V. Kazakov CSc.

2. Postižení sliznice dutiny ústní v rámci toxické mukozitidy a reakce štěpu proti hostiteli u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s užším zaměřením na protokol předtransplantační přípravy FLU/MEL

2.1. Přehled o současném stavu problematiky:

2.1.1. Mukozitida dutiny ústní

2.1.1.1. Úvod a definice pojmu

Mukozitida dutiny ústní (MDU) reprezentuje charakteristický typ postižení sliznic a podslizniční tkáně vzniklý v souvislosti s chemoterapií nebo aktinoterapií. Synonymem pro MDU může být výraz stomatitida, ten se ale spíše používá u postižení dutiny ústní jiné etiologie (1). MDU omezuje perorální příjem, zvyšuje incidenci infekcí, prodlužuje hospitalizaci a zvyšuje náklady (2). Pacienty po transplantaci krvetvorných buněk je velmi negativně vnímána (3).

2.1.1.2. Patofyziologie MDU

Procesy podmiňující rozvoj MDU jsou komplexní. Kromě epitelu se změny odehrávají i v submukóze, kde dochází k poškození fibroblastů i endotelií spolu s agregací trombocytů v kapilárách. Podle S.Sonise (4) je definováno pět fází průběhu MDU - **Iniciace:** přímé poškození DNA, apoptóza epitelí bazální vrstvy, endotelií a fibroblastů v submukóze. **Up-regulace:** aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF-kappaB), nadprodukce prozánětlivých cytokinů (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6), aktivace sfingomyelinázy a ceramid-syntetázy, poškozování tkáně. **Amplifikace:** zvýraznění změn, pozitivní zpětná vazba procesu. **Ulcerace:** ztráta integrity sliznice, infekce, zánět, fibrinová pablána na ulceracích. **Hojení:** z oblasti submukózy stimulace migrace, proliferace a diferenciacie epiteliálních buněk a vyhojení defektů (4).

2.1.1.3. Klinický obraz a souvislosti při MDU

Změny na sliznici jsou patrné nejčastěji 4-8 dní po chemoterapii a přetrvávat mohou podle tíže poškození zhruba 7 až 14 dní. Lze pozorovat prosáknutí sliznic, na bukální

sliznici a po okraji jazyka „žebrování“ z otisků zubů (tzv. scalloping). Dále erytém, atrofie (na jazyku vyhlazení papil), defekty kryté pablánou odhojící se od okrajů. Poškozená bariéra usnadňuje průnik patogenům a zvyšuje incidenci bakteriémie viridujících (alfa-hemolytických) streptokoků (7,8) a pronikat mohou i *Candida* sp., *Fusobacterium*, koaguláza-negativní stafylokoky, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (9).

MDU bývá doprovázena dyskomfortem, bolestivostí, která může vyžadovat i aplikaci analgetik včetně opiátů (10), může být porucha vnímání chuti, snížená salivace a omezení perorálního příjmu potravy i tekutin. V souvislosti s alogenní transplantací krvetvorných buněk nelze pominout ani význam v patogenezi akutní reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), která je nejspíše predisponována vyššími hladinami prozánětlivých cytokinů, které jsou vyplavovány také při mukozitidě, a dále také vlivem střevní mikroflóry a průnikem bakteriálních toxinů (6, 12, 13). Na druhé straně akutní GvHD může přispět k modifikaci průběhu MDU ve smyslu delšího přetrvávání slizničního postižení dutiny ústní (14).

2.1.1.4. Výskyt MDU

Výskyt variabilní v závislosti na intenzitě a typu chemoterapie. V případě intenzivních vysokodávkovaných režimů s transplantací krvetvorných buněk se objevuje u 60-100% pacientů podle typu předtransplantační přípravy (11, 14). Při běžné chemoterapii je výskyt přibližně do 15%, u irinotecanu více než 20% a po léčbě 5-fluorouracilem až u 40% pacientů (11, 15). Průběh a výskyt MDU není při shodných režimech chemoterapie stejný, ale má individuální odlišnosti – viz Rizikové faktory.

2.1.1.5. Rizikové faktory MDU

S intenzitou chemoterapie a s ohledem na typ cytostatika se zvyšuje incidence a tíže MDU. Mezi individuální faktory bývá zahrnována řada proměnných, ale většina je neověřená nebo kontroverzní. Nelze zatím jasně potvrdit, do jaké míry je rizikové např. ženské pohlaví, vliv věku, hodnoty body mass indexu (BMI) nebo obsah CD34+ buněk v autologním štěpu periferních krvetvorných buněk (10, 19-26). Kuřáctví nemá negativní vliv (20, 22, 23, 27). Významná je genetické predispozice k citlivosti na cytostatika, polymorfismus enzymů zodpovědných za degradaci 5-fluorouracilu a metotrexátu (16, 17). U pacientů s psoriázou je nižší riziko MDU nejspíše při nižší tendenci k apoptóze (18).

2.1.2. Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) v dutině ústní

2.1.2.1. Úvod a definice pojmu

Chronická reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, graft versus host disease) je projevem imunitního poškození tkáně příjemce vlivem dárcovských T-lymfocytů ze štěpu.

2.1.2.2. Patofyziologie GVHD

GVHD vzniká následkem interakcí mezi dárcovskými T-lymfocyty přenesenými štěpem a antigen-prezentujícími buňkami příjemce. Úvodním krokem je vyplavení prozánětlivých cytokinů (TNF-alfa, IL-1) např. na základě tkáňového poškození vlivem předtransplantační přípravy (chemoterapie, aktinoterapie). Tato tzv. „cytokinová bouře“ aktivuje příjemcovy antigen-prezentující buňky. Vrcholem kaskády je zapojení NK-buněk, LGL-lymfocytů a rozvoj vlastního tkáňového poškození (28).

2.1.2.3. Klasifikace GVHD

Rozlišujeme akutní nebo chronickou GVHD. Podle aktuálních doporučení National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference je pro rozlišení rozhodující klinický obraz, nikoliv doba nástupu komplikace po transplantaci (mezník v den +100). Navíc je vymezen tzv. overlap syndrom s projevy akutní i chronické GVHD (41, 28).

Při akutní GVHD dominuje postižení bazální vrstvy epidermis, střevního epitelu a žlučových cest s projevy kožního erytému, bul i deskvamace (v těžkých případech), rozvojem vodnatých průjmu a vzestupu bilirubinu. Chronická GVHD se prezentuje ve formě připomínající autoimunitní postižení typu sklerodermie, Sjögrenova syndromu, primární biliární cirhózy, obliterující bronchiolitidy atp.

2.1.2.4. Klinický obraz GVHD v dutině ústní

Klinický obraz při akutním i chronickém postižení může připomínat toxickou mukozitidu dutiny ústní v podobě erytému, atrofie, ulcerací a bolesti. V případě chronické GVHD jsou jako typické udávány lichenoidní změny a hyperkeratóza. Postižení slinných žláz se projevuje sníženou tvorbou slin a pocitem suchosti (41).

2.1.2.5. Histologický nálezn při GVHD v dutině ústní

Histopatologické literatury o GVHD v ústní dutině je málo (48). V praxi se proto běžně používají podobná kritéria jako pro hodnocení GVHD v kůži. Histologické nálezy

akutní GVHD v ústní dutině nejsou dosud podrobněji charakterizovány. U chronické GVHD se v ústech popisují: hydropické změny epitelů v bazální vrstvě, apoptotická tělíčka, lymfocytární infiltrace a fokální či totální odštěpení epitelu od subepiteliálního pojiva (tzv. "cleavage") (48). Diferenciálně diagnosticky přichází v úvahu lichen ruber planus, lichenoidní reakce na protézu a lékový nebo virový původ. Ve slinných žlázkách bývá lymfocytární infiltrát, atrofie acinů a mírná intersticiální fibrotizace (48). Lymfocytární infiltrát je převážně T-povahy (48, 49, 50). B-lymfocyty prakticky chybí, ale plasmocyty a makrofágy bývají přítomny (48, 51).

2.1.2.6. Výskyt GVHD

Incidence kolísá mezi 10-80% s ohledem na rizikové faktory, kam patří především HLA kompatibilita dárce a příjemce, typ předtransplantační přípravy, typ prevence GVHD, věk příjemce, štěp periferních krvetvorných buněk a dárkyně po opakovaném těhotenství (28). Sliznice dutiny ústní může být postižena jak v rámci akutní GVHD, tak především při GVHD chronické, kdy bývá u 38%-46% transplantovaných, respektive 54-80% pacientů s chronickou GVHD (29, 30, 31, 32).

2.1.3. Přípravné režimy alotransplantací krvetvorných buněk

2.1.3.1 Konvenční a redukované režimy

V rámci registru EBMT (The European Group for Blood and Marrow Transplantation) bylo v r.2000 evidováno 6404 alogenních transplantací a v r.2006 již 9661 (33, 34).

Mezi standardní protokoly předtransplantační přípravy patří režim Bu/CY2/±ATG zahrnující vysocedávkovaný busulfan s cyklofosfamidem. Význam mají čím dál více i transplantace s tzv. redukovanou intenzitou přípravy, které jsou alternativou pro starší a předlžené pacienty z důvodu nižší toxicity (35).

2.1.3.2. Režim FLU/MEL

Mezi protokoly s redukovanou intenzitou přípravy patří režimy FLU/CY s fludarabinem a cyklofosfamidem nebo FLU/MEL s fludarabinem 125-150mg/m² a melfalanem 140-180mg/m². FLU/MEL je účinný ve spektru hematologických malignit, má potenciál zajistit přihojení štěpu a minimum toxických fatálních komplikací (36, 37, 38, 39, 40). I zde byla pozorována toxicita dutiny ústní (37, 40). Publikované zkušenosti s FLU/MEL jsou však více zaměřeny na přihojení štěpu, dobu do

progrese nebo relapsu nemoci, celkové přežití a výskyt GVHD (36, 37, 38, 39, 40). Specifikace a bližší popis postižení dutiny ústní v rámci MDU a GVHD jsou v souvislosti s protokolem FLU/MEL nedostatečné.

2.2. Cíl práce:

Charakterizovat klinické a morfológické rysy postižení dutiny ústní v rámci MDU a GVHD u pacientů po alogenní transplantaci krvinek s ohledem na předtransplantační přípravu a především se zaměřením na režim FLU/MEL.

2.3. Metodika:

2.3.1. Pacienti a léčba

V období 1/2005-12/2007 byli do prospektivního sledování na transplantačním centru Hematologicko-onkologického oddělení FN v Plzni zařazeni pacienti, u kterých byla zahájena příprava k alogenní transplantaci krvinek s konvenční přípravou BU/CY2±ATG nebo s redukovanou intenzitou přípravy podle protokolů FLU/MEL, FLU/CY, Bu/FLU/ATG nebo HD-CY/ATG. Pacienti podepsali s léčbou a sledováním informovaný souhlas. Sledování bylo ukončeno předčasně v případě úmrtí, podání nové chemoterapie, transplantace nebo infuze dárcovských lymfocytů.

2.3.2. Protokoly předtransplantační přípravy

- Bu/CY2±ATG: celková dávka busulfan 16mg/kg p.o. nebo 12.8 mg/kg i.v., cyklofosamid 120 mg/kg i.v., antitymocytní globulin (ATG) u nepříbuzenských nebo HLA neidentických transplantací 15 mg/kg i.v.
- FLU/MEL: celková dávka fludarabin 120 mg/m² i.v., melfalan 140mg/m².
- FLU/CY: celková dávka fludarabin 75mg/m² i.v., cyklofosamid 140mg/m²/den.
Bu/FLU/ATG: celková dávka busulfan 10mg/kg, fludarabin 180 mg/m² i.v., ATG 30mg/kg.
- HD-CY/ATG: celková dávka cyklofosamid 200mg/kg, ATG 30mg/kg.

2.3.3. Péče o dutinu ústní

Byla zahájena v den předtransplantační přípravy, prováděna 4x denně, v případě MDU i častěji. Roztoky byly voleny s ohledem na přání pacienta a byly nabízeny přípravky s obsahem chlorhexidinu, benzydaminu, fyziologický roztok, roztok

s obsahem lokálního anestetika (trimecain) nebo šalvějový roztok. Chrup byl čištěn měkkými kartáčky po hlavním jídle. V případě krvácivosti dásní nebo bolestivosti byly k čištění doporučeny pouze roztoky. Snímatelné zubní náhrady byly odkládány během noci, při péči o dutinu ústní a při rozvoji MDU. V případě GVHD postižení úst byly doporučeny navíc výplachy s roztoky s dexamethasonem 0,2-0,4% a viskózní přípravky s obsahem hyaluronátu. Amifostin, palifermin ani kryoterapie nebyly v rámci profylaxe MDU aplikovány.

2.3.4. GVHD profylaxe

V režimu BU/CY2/±ATG byl podáván Cyklosporin A (CyA) od dne -1 s úpravou dávky dle hladin po dobu 6 měsíců při nepřítomnosti GVHD, a dále metotrexát (MTX) 15mg/m² i.v. v den + 1 a 10mg/m² v den + 3, + 6 (individuálně den +11) se zajištěním aplikace leukovorinu. U nepříbuzenských nebo HLA neshodných transplantací byla doplněna „in vivo“ T-deplece s antitymocyárním globulinem (ATG). V režimu FLU/MEL, FLU/CY, Bu/FLU/ATG, HD-CY/ATG byl podáván CyA od dne -1 před transplantací s úpravou dávky dle hladin s předpokladem podávání po 3 měsíce a modifikací délky podávání s ohledem na GVHD, stav malignity a monitorovaný chimérismus v kostní dřeni. Doplněn byl dále MTX 10mg/m² i.v. v den + 1, + 3, + 6 (individuálně den +11) se zajištěním aplikace leukovorinu. V protokolu Bu/FLU/ATG, HD-CY/ATG byl navíc podáván ATG.

2.3.5. Antimikrobiální profylaxe

V rámci profylaxe bakteriálních infekcí byly do doby přihojení štěpu podávány chinolony, dále pak do ukončení imunosuprese amoxicilin-klavulanát nebo cefuroxim a trimethoprim-sulfomethoxazol. Dále až do ukončení imunosupresivní léčby byl zajištěn acyklovir a fluconazol nebo itrakonazol. Byla uplatňována pre-emptivní léčba cytomegalovirové infekce ganciclovirem nebo foscarnetem.

2.3.6. Další podpůrná péče

Pacienti byly umístěni na jednolůžkovém pokoji s filtrací vzduchu HEPA filtry a ošetřováni v režimu ochranné (reverzní) izolace. Transfuze erytrocytů a trombocytů byly vždy deleukotizované a ozářené dávkou 25Gy. Filgrastim 5ug/kg/den byl aplikován v případě BU/CY2/±ATG od dne +1 po transplantaci a v případě FLU/MEL, FLU/CY, Bu/FLU/ATG, HD-CY/ATG od dne +5.

2.3.7. Monitorace, hodnocení a definice

Sledování stavu sliznic rtů, bukálně, na jazyku a na patře probíhalo denně během hospitalizace od zahájení předtransplantační přípravy a dále při pravidelných ambulantních kontrolách v potransplantačním období.

Tíže MDU byla hodnocena podle WHO kritérií se stupni 0 až 4 (0 = žádné, 1 = bolest a zarudnutí, 2 = defekty a možnost jíst tuhou potravu, 3= defekty a možnost pouze tekutin a kaší, 4= příjem nemožný pro mukozitidu).

Diagnostika GVHD byla prováděna s ohledem na kritéria NIH (41) akceptovaná rovněž v rámci EBMT (28). Celková tíže akutní GVHD byla hodnocena podle Glucksberga (42), chronická GVHD pak podle NIH kritérií (41).

Postižení dutiny ústní související s GVHD reakcí bylo hodnoceno podle kritérií NIH - National Institutes of Health (41) se stupni postižení 0-3 (0 = žádné obtíže a známky postižení, 1= mírné obtíže a projevy bez významného omezení orálního příjmu, 2= středně těžké obtíže a projevy s částečně omezeným orálním příjmem, 3= těžké postižení s významným omezením orálního příjmu).

2.3.8. Odběr a zpracování vzorku sliznice dutiny ústní

Při podezření na GVHD dutiny ústní u pacientů léčených FLU/MEL a v souhlasu byly vzorky sliznice dutiny ústní odebírány stomatologem v místní anestezii z oblasti bukální sliznice v místě lichenoidních změn. Vzorky (max. průměru 4 -11 mm) byly fixovány v 10% pufovaném roztoku formolu a následně zality do parafinových bloků. Řezy o tloušťce 2 μ m byly barveny hematoxylinem-eozinem. Histologický odečet proběhl na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu LF UK a FN v Plzni.

2.3.9. Statistické zpracování

Provedeno s využitím programu GraphPad InStat - Statistica Software a byly použity základní statistické testy Mann-Whitney, Fisher a t-test. Rozdíly mezi skupinami byly testovány na hladině významnosti 95% a hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za staticky vyznané rozdíly. Potenciální rizikové faktory MDU byly podrobeny multivariantní analýze. Logistická regrese byla použita k ověření závislosti vztahu výskytu MDU a akutní GVHD.

2.4. Výsledky:

V období 1/2005-12/2007 bylo do sledování zařazeno 117 pacientů s mediánem doby sledování 357 (6-1230) dní. Režimy předtransplantační přípravy zahrnovaly konvenční Bu/CY2/±ATG (26%) a protokoly s redukovanou intenzitou FLU/MEL (60%), FLU/CY (10%), Bu/FLU/ATG (2%) a HD-CY/ATG (2%). Parametry souboru jsou blíže uvedeny v tabulce č.1.

Tabulka č.1:

Charakteristiky pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Charakteristika	
n=	117
Délka sledování (dny)	357 (6-1230)
Věk (roky)	53 (20-68)
Pohlaví – muži : ženy	53% : 47%
Diagnózy:	
<i>AML – akutní myeloidní leukémie</i>	47 / 117 (40%)
<i>ALL – akutní lymfoblastická leukémie</i>	13
<i>NHL – nonhodgkinský lymfom</i>	13
<i>CLL – chronická lymfocytární leukémie</i>	12
<i>MDS – myelodysplastický syndrom</i>	7
<i>MM – mnohočetný myelom</i>	7
<i>CML – chronická myeloidní leukémie</i>	6
<i>HL – Hodgkinův lymfom</i>	5
<i>SAA – těžká aplastická anémie</i>	4
<i>OMF - osteomyelofibróza</i>	3
Předtransplantační příprava:	
<i>FLU/MEL</i>	71 / 117 (60%)
<i>Bu/CY2/±ATG</i>	30 (26%)
<i>FLU/CY</i>	12 (10%)
<i>HD-CY/ATG</i>	2 (2%)
<i>Bu/FLU/ATG</i>	2 (2%)
HLA identický dárce:	92 / 117 (78%)
Sourozenecký dárce:	41 / 117 (35%)
Štěp: periferní krvetvorné buňky : kostní dřeň	90% : 10%
Obsah CD34+ buněk ve štěpu (x10⁶/kg), medián	4,97 (1,6 - 22,8)
Clearance kreatininu (ml/s), medián	1,56 (0,4 – 3,8)
Bilirubin (umol/l), medián	12 (6 - 52)
Granulocyty nad 1x10⁹/l po transplantaci od dne, medián	14 (0 - 34)

2.4.1. MDU v rámci celého souboru

V rámci celé skupiny transplantovaných došlo k rozvoji MDU u 87/117 (74%) pacientů. Incidence se lišila podle typu předtransplantační přípravy – protokol Bu/CY2/±ATG: 100%, FLU/MEL: 78%, FLU/CY: 9% pacientů (p=0,0046). Těžká MDU st.3-4 dle WHO byla pozorována pouze po přípravě Bu/CY2/±ATG (43%) a

FLU/MEL (38%). Protokoly Bu/FLU/ATG a HD-CY nebyly dále analyzovány pro minimální četnost. Bližší údaje o MDU v celém souboru jsou v tabulce č.2.

Tabulka č.2:

Charakteristiky mukozitidy dutiny ústní (MDU) u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk

Charakteristika	
n=	117
MDU incidence:	
<i>v celém souboru</i>	87/117 (74%)
<i>Bu/CY2/±ATG</i>	30/30 (100%)
<i>FLU/MEL</i>	55/71 (78%)
<i>FLU/CY</i>	1/12 (9%)
MDU st. 3-4 dle WHO, incidence:	
<i>v celém souboru</i>	40/117 (34%)
<i>Bu/CY2/±ATG</i>	13/30 (43%)
<i>FLU/MEL</i>	27/71 (38%)
<i>FLU/CY</i>	0/12 (0%)
MDU max. stupeň dle WHO, medián	2 (1-4)
MDU start, medián den po transplantaci	5 (2-13)
MDU trvání, medián dny	12 (1-34)
MDU ústup, medián den po transplantaci	17 (9-37)

2.4.2. MDU v rámci FLU/MEL vs. Bu/CY2

Hodnoceno bylo 71 pacientů alogenně transplantovaných po přípravě FLU/MEL a 30 pacientů po Bu/CY2/±ATG. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami ve smyslu zastoupení pohlaví, sourozeneckých nebo HLA identických transplantací, obsahu CD34+ buněk ve štěpu a hodnot clearance kreatininu a hladin bilirubinu u pacientů. Statisticky významné rozdíly byly zastiženy jen v četnějším zastoupení starších pacientů, štěpu periferních krvetvorných buněk a časnější reparační granulopoézy u FLU/MEL protokolu. Bližší údaje jsou uvedeny v tabulce č.3.

Tabulka č.3:

Charakteristiky srovnávaných souborů FLU/MEL vs. Bu/CY2±ATG

Charakteristika	FLU/MEL	Bu/CY2/±ATG	p=
n=	71	30	-
věk (roky), medián	56 (23-68)	35 (20-55)	< 0.0001
pohlaví - muži	51 %	57 %	NS
dárce štěpu – sourozenec	44 %	24 %	NS
HLA identický dárce	79 %	73 %	NS
štěp: periferní krvetvorné buňky	100 %	67 %	< 0.0001
počet CD34+ ve štěpu (x10 ⁶ /kg), medián	4,95 (1,6-15,2)	5,05 (2,2-22,8)	NS
clearance kreatininu (ml/s), medián	1,5 (0,4-3,0)	1,8 (0,7-3,3)	NS
bilirubin (umol/l), medián	13 (6-52)	11 (6-38)	NS
granulocyty >1x10⁹/l po transplantaci od dne, medián	13 (0-26)	15 (11-34)	0.0007

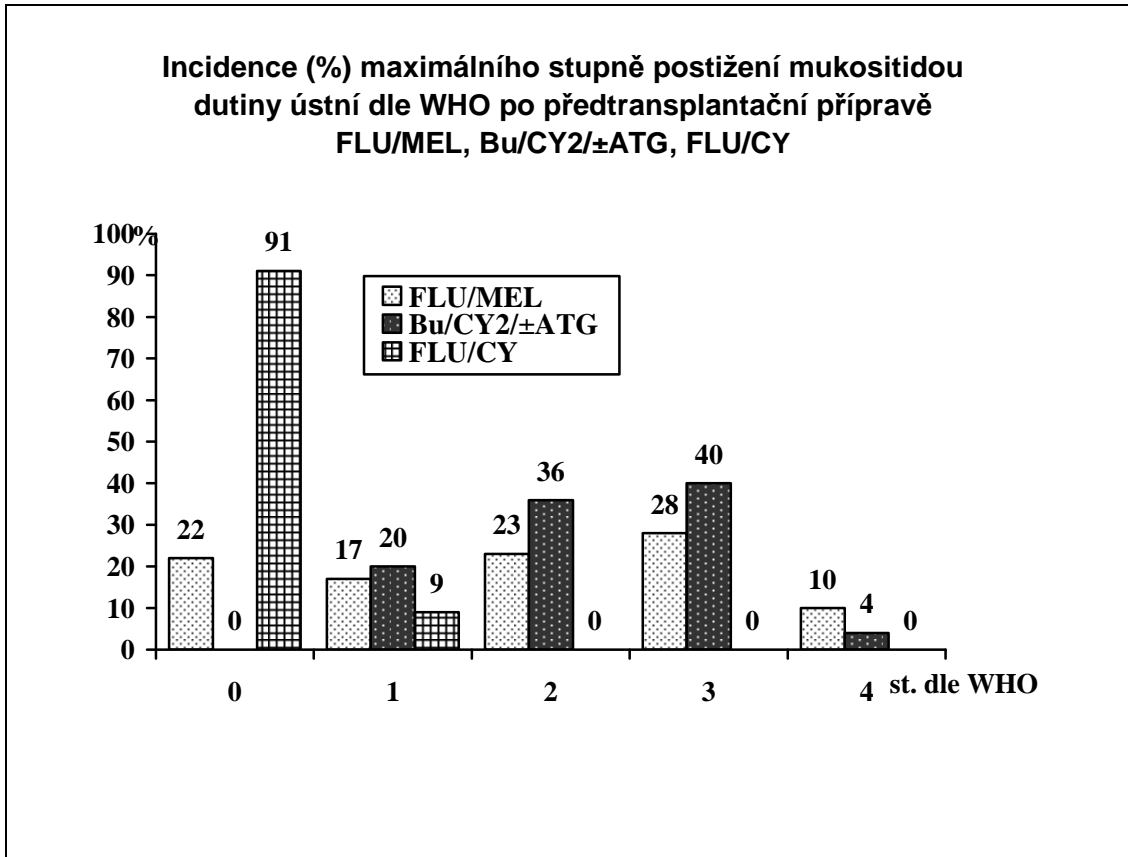
Po FLU/MEL mělo MDU 78% pacientů. U 38% bylo postižení těžké (st.3-4 WHO) s perorálním příjmem vyloučeným nebo omezeným na tekutiny a kaše. K rozvoji MDU došlo v mediánu od dne 6 (2-10) po transplantaci, MDU přetrvávala 12 (1-34) dní a ustupovala v mediánu den 18 (9 - 37) po transplantaci. Výsledky srovnání charakteristik se skupinou Bu/CY2/±ATG jsou v tabulce č.4 a v grafu 1 a 2 dále.

Tabulka č.4:

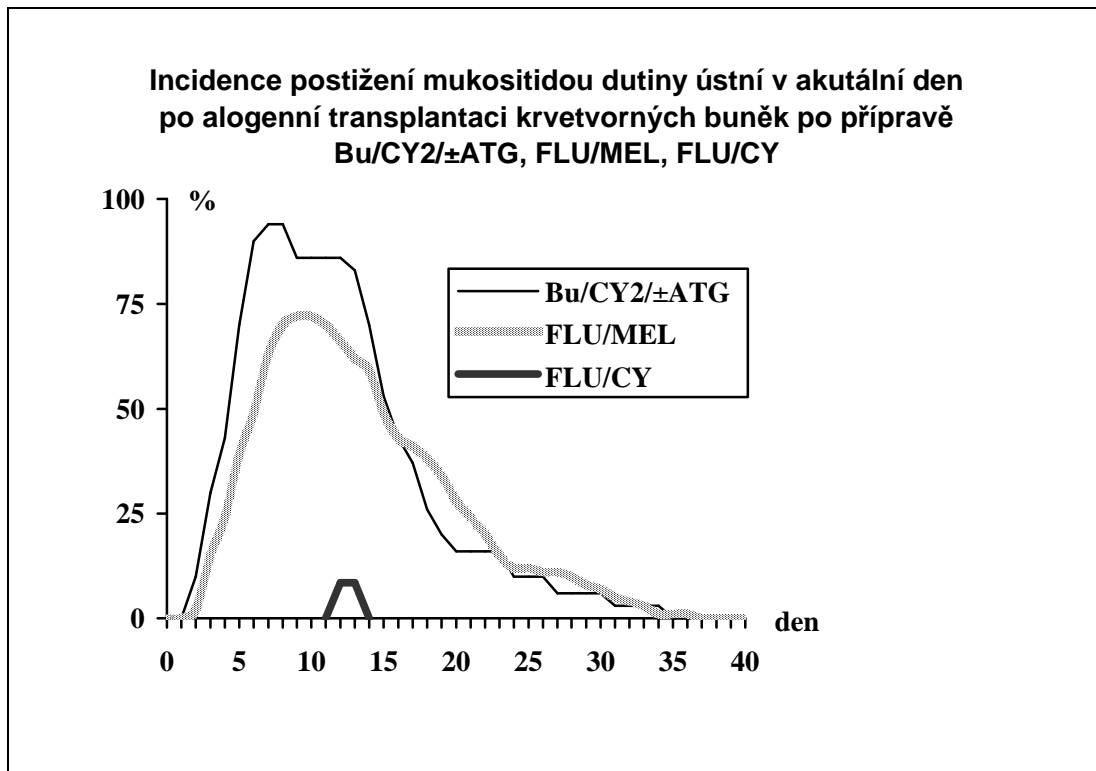
Charakteristiky MDU v souborech FLU/MEL vs. Bu/CY2

Charakteristika	FLU/MEL	Bu/CY2/±ATG	p=
n=	71	30	-
MDU incidence	78 %	100 %	0.004
MDU st. 3-4 dle WHO, incidence	38 %	43 %	NS
MDU max. stupeň dle WHO, medián	2 (1-4)	2 (1-4)	NS
MDU start od dne po transplantaci, medián	6 (2-10)	5 (2-13)	NS
MDU ústup dne po transplantaci, medián	18 (9-37)	16 (9-35)	NS
MDU trvání dní, medián	12 (1-34)	11 (2-31)	NS

Graf č.1:



Graf č.2:



2.4.3. Statistická analýza potenciálních rizikových faktorů MDU

V multivariantní analýze celého souboru 117 pacientů byl jako nezávislý rizikový faktor pro incidenci a tíži MDU prokázán typ přípravného předtransplantačního režimu - Bu/CY2 vs. FLU/MEL vs. FLU/CY ($p=0,0001$). Nebyl prokázán vliv věku, pohlaví, body mass indexu, HLA kompatibility dárce a příjemce, typu štěpu, obsahu CD34+ buněk ve štěpu, hladiny bilirubinu, clearance kreatininu, počtu dní od poslední chemoterapie, anamnézy MDU v minulosti a přítomnosti zubních protéz nebo diabetu. V případě souboru FLU/MEL byla MDU významně častěji u žen (89% vs. 67%, $p=0,045$), u pacientů s dávkou melfalanu $\geq 3,5$ mg na kilogram hmotnosti pacienta (88% vs. 65%, $p=0,037$) a dále u pacientů s nižším body mass indexem (26 (14-39) vs. 28 (17-43), $p=0,018$).

2.4.4. Akutní GVHD a postižení dutiny ústní u FLU/MEL

Po FLU/MEL přípravě bylo akutní GVHD postižení sliznic patrné u 6/71 (8%), respektive u 6/29 (21%) pacientů s klinicky zřejmou akutní GVHD. Nebyl signifikantní rozdíl v postižení dutiny ústní u FLU/MEL vs. Bu/CY2/ \pm ATG (8% vs. 4%, $p=0,67$). Nástup postižení dutiny ústní byl v mediánu dne 85 (40-140) po transplantaci, v délce trvání 24 (7-54) dní a s ústupem v den 113 (93-150) po transplantaci. U všech pacientů byla pro celkovou tíži GVHD větší než st.2 dle Glucksberga zahájena léčba imunosupresí s cyklosporinem A a metylprednisolonem.

Subjektivní obtíže: suchost úst 4/6 (67%), bolest 2/6 (33%), bez problémů 1/6 (17%).

Makroskopické změny: lichenoidní změny 5/6 (83%), erytém 2/6 (33%), defekt-pseudomembrána 1/6 (17%), atrofie 1/6 (17%).

Četnost max st. postižení DÚ dle NIH (st. 0-3): st.1- 5/6 (83%), st.2- 1/6 (17%), st.3- 0

Četnost postižení regionů: bukální oblast 6/6 (100%), jazyk 2/6 (33%), rty 1/6 (17%), patro 1/6 (17%).

2.4.5. Chronická GVHD a postižení dutiny ústní u FLU/MEL

Po FLU/MEL bylo postižení dutiny ústní v rámci chronické GVHD patrné u 21/71 (29%), respektive u 21/29 (72%) pacientů s chronickou GVHD (17% pacientů mělo v rámci chronické GVHD přítomno pouze izolované postižení dutiny ústní). Nebyl signifikantní rozdíl v postižení u FLU/MEL vs. Bu/CY2/ \pm ATG (29% vs. 20%, $p=0,46$). Postižení dutiny ústní nastupovalo v mediánu dne 230 (107-540) po transplantaci,

přetrvávalo 135 (11-665) dní a ustupovalo dne 362 (178-835). U pacientů s izolovaným GVHD postižením DÚ byla zajištěna lokální léčba s využitím roztoku s dexamethasonem, 18% pacientů bylo léčeno monoterapií s cyklosporinem a 65% kombinovanou systémovou imunosupresí s cyklosporinem a metylprednisolonem.

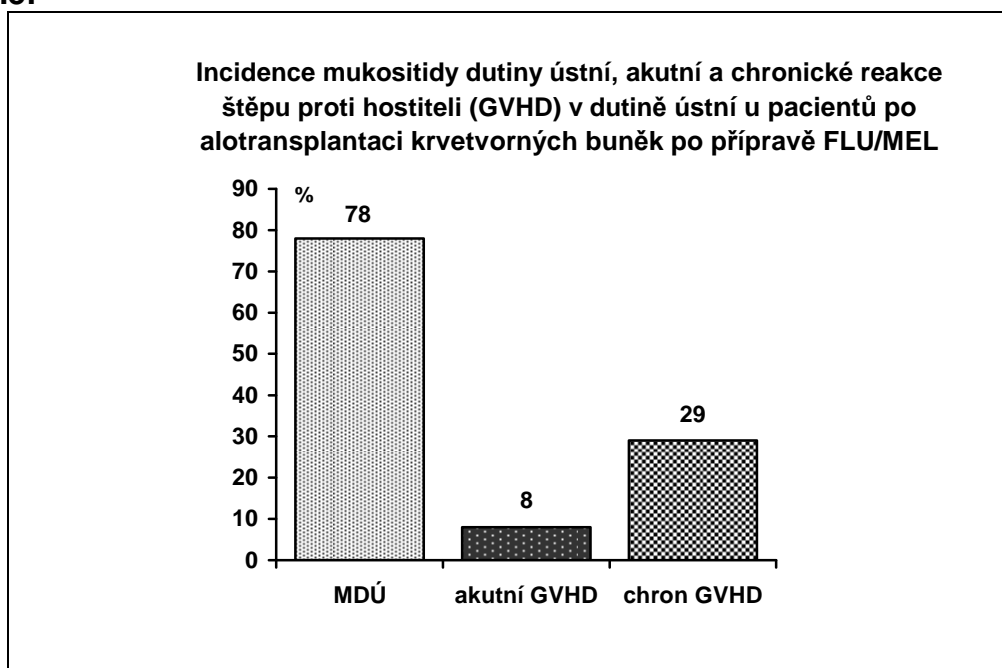
Subjektivní obtíže: suchost sliznic 15/21 (71%), bolest 11/21 (52%), dyskomfort 6/21 (29%), bez problémů 3/21 (14%).

Makroskopické změny sliznice: lichenoidní změny 21/21 (100%), erytém 8/21 (38%), defekt-pseudomembrána 10/21 (48%), atrofie 3/21 (14%).

Četnost max st. postižení DÚ dle NIH (st.0-3): st.1- 17/21(80%), st.2- 2/21(10%), st.3- 2/21(10%).

Četnost postižených regionů: bukální oblast 21/21 (100%), jazyk 9/21 (43%), rty 7/21 (33%), patro 7/21 (33%), současné postižení všech lokalit 4/21 (19%).

Graf č.3:



2.4.6. Vztah MDU a GVHD

Stav, kdy došlo k rozvoji akutní GVHD u pacienta s ještě nezhojenou MDU byl v celém souboru transplantovaných pacientů pozorován u 50% (11/22) pacientů s MDU perzistující v den +21 a déle. Vedle toho pak byla u pacientů s takto protražovanou MDU také signifikantně zvýšena incidence akutní GVHD (68% vs. 32%, $p=0,005$). Logistická regrese potvrdila významnou závislost akutní GVHD na tíži a protražovaném trvání MDU ($p=0,044$, $p=0,005$).

2.4.7. Histologické nálezy:

Histologické hodnocení bylo verifikováno u případů klinicky zřejmého GVHD postižení dutiny ústní po přípravě FLU/MEL. Z celkem 27 případů GVHD bylo na základě souhlasu 14 pacientů odebráno 14 vzorků bukalní sliznice. Dva vzorky byly zhmožděné odběrem a byly hodnoceny patologem jako nerepresentativní.

V celkem 12 vzorcích (4x pacient s klinicky akutní GVHD, 8x s klinicky chronickou GVHD) odebraných v mediánu dne 165 (78-420) po transplantaci bylo provedeno běžné histologické hodnocení v době diagnózy a dále byla později ještě provedena revize všech hodnotitelných vzorků.

Při revizi prováděné histopatologem šlo o „slepé hodnocení“, kdy jedinou informací u histologického preparátu byla klinická diagnóza GVHD (jako kritérium pro zařazení do studie), bez znalosti doby po transplantaci, makroskopického vzhledu a podobně. Byly hodnoceny znaky jako u GVHD v kůži (56) a rysy popsané v jediné obsáhlejší klinicko-histopatologické studii o GVHD v ústní dutině (Soares et al., 48). Tyto základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č. 5, která uvádí současně výsledky hodnocení souboru histologických vzorků.

Na základě přítomnosti uvedených znaků, z nichž za nejdůležitější považujeme „interface dermatitis“ s apoptózami včetně satelitních nekrot, jsme stanovili, že nálezy jsou v souladu s klinickou diagnózou GVHD. Nebyly patrné histologické vlastnosti, které by umožnily mikroskopicky rozlišit akutní GVHD od chronické. U akutní GVHD jsme našli častěji eozinofily a akantózu, ale nepovažujeme to za diagnosticky signifikantní.

Odštěpení epitelu od subepiteliálního pojiva (cleavage) jsme neprokázali – náznak tohoto jevu jsme pozorovali vzácně, je na fotografii č. 8, ale takovou to velmi drobnou změnu jsme hodnotili jako „negativní“. Cleavage v rámci zánětu by mělo být odlišeno od arteficiálních trhlin vzorku, které jsou časté. Slinné žlázy byly zachyceny ve 4 z 12 vzorků (33%), obsahovaly fibrózu, atrofii acinů a zánětlivý infiltrát (fotografie č. 9 a 10). Výrazný edém subepiteliálního vaziva s extravazáty erytrocytů byl patrný v 1 případě chronické GVHD.

Tabulka č. 5:

Histologické nálezy GVHD dutiny ústní u pacientů po alogenní transplantaci krevetvorných buněk po přípravě FLU/MEL.

Znak	Počet případů GVHD (celkem: 12)	Případy aGVHD (4)	Případy cGVHD (8)
“Interface dermatitis“	12 (100%)	4 (100%)	8 (100%)
Hydropické změny bazální vrstvy epitelu	10 (83%)	4 (100%)	5 (63%)
Lymfocytární infiltrát v junkci	12	4 (100%)	8 (100%)
Apoptózy, satelit nekrózy	12 (100%)	4 (100%)	8 (100%)
Atrofie epitelu	3 (25%)	1 (25%)	2 (25%)
Akantóza	7 (58%)	3 (75%)	4 (50%)
Parakeratóza	3 (25%)	1	2 (25%)
Spongióza	2 (17%)	0	1 (12,5%)
Dysplazie keratinocytů	2 (17%)	0	2 (25%)
Eosinofily	6 (50%) (1 výrazné)	3 (75%)	3 (38%) (1 výrazné)
Cleavage	0	0	0
Fibróza stromatu	0	0	0
Edém pojiva	1 (8%)	0	1(12,5%)
Slinné žlázy	4 (33%)	1 (25%)	3 (38%)
Fibróza slinných žlaz	3	1	2
Atrofie acinů	3	1	2
Zánětlivý infiltrát	4	1	3

Poznámka: Výraz “interface dermatitis“ používáme v ústní dutině jako terminus technicus převzatý z kůže, protože pregnančně popisuje mikroskopický nález a je v histopatologické praxi zažitý (s vědomím, že výraz dermatitis není v ústní dutině zcela na místě).

2.5. Diskuze:

Cílem práce bylo charakterizovat klinické a morfologické rysy postižení dutiny ústní v rámci MDU a GVHD u pacientů po alogenní transplantaci krevetvorných buněk s ohledem na předtransplantační přípravu a především se zaměřením na režim FLU/MEL, o jehož orální toxicitě zatím nejsou publikovány prakticky žádné

zkušenosti a současně v písemnictví chybí i přehledné údaje o charakteristikách akutní GVHD v oblasti dutiny ústní.

Do prospektivního sledování byl zařazen reprezentativní počet 117 pacientů léčených alogenní transplantací krevetvorných buněk. Většina byla transplantována po přípravě FLU/MEL (n=71) a dále po Bu/CY2/±ATG (n=30). Charakter předtransplantační přípravy byl v multivariantní analýze statisticky signifikantně ($p=0,0001$) prokázán jako nezávislý rizikový faktor pro výskyt MDU u jednotlivých režimů s maximem toxicity v rámci Bu/CY2/±ATG (100%), dále FLU/MEL (78%) a minimem výskytu po FLU/CY (9%).

S ohledem na četnost v souborech byly další analýzy zaměřeny na FLU/MEL a BU/CY2/±ATG. Mezi oběma skupinami nebyly významné rozdíly v základních demografických a transplantačních charakteristikách. Vyšší věk, zastoupení štěpu periferních krevetvorných buněk a časnější reparace granulopoézy u pacientů s FLU/MEL vyplývá již z podstaty tohoto protokolu s redukovanou intenzitou, který je primárně určen pro starší a silně předléčené pacienty (35, 36, 37, 38, 39, 40).

MDU po přípravě FLU/MEL se ve srovnání s konvenčním BU/CY2/±ATG vyskytla sice statisticky signifikantně méně (78% vs. 100%, $p=0,0046$), ale z pohledu klinického stále ve velmi významné důležitosti. Obzvláště pak s ohledem na to, že incidence těžké MDU st. 3-4 dle WHO a rovněž další popisované charakteristiky této komplikace (nástup, trvání, ústup MDU) byly v obou skupinách srovnatelné. Rozdíl věku pacientů mezi skupinami nejspíše neměl na MDU vliv. Dosavadní práce nic takového neprokazují nebo mají výsledky protichůdné (10, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 43) a navíc ani v rámci našeho sledování a statistických analýz toto nebylo potvrzeno.

Výskyt MDU (78%) ve sledované skupině FLU/MEL pacientů byl lehce nižší, než pozorováno u Krögera et al. (37) s incidencí 88%, ten ale používal k hodnocení toxicity jiné metodiky než podle WHO. Aisa et al. (40) s incidencí 85% zase zařadil do sledování i pacienty s přípravou doplněnou o celotělové ozáření nebo vysokodávkovaný cytosin-arabinosid.

Významnou roli v orální toxicitě protokolu FLU/MEL nesporně hraje melfalan, který je jinak zodpovědný za MDU v případě monochemoterapie s melfalanem v rámci vysokodávkované přípravy před autologní transplantací periferních krevetvorných buněk (24, 43). U fludarabinu naopak taková toxicita popsána nebyla. Na druhé straně je však nutno podotknout, že na rozvoj a charakter MDU mohl mít vliv kromě samotné chemoterapie v předtransplantační přípravě také metotrexát aplikovaný

v rámci prevence GVHD, jak bylo potvrzeno v několika sledováních (44, 45, 46). Zhodnotit vliv metotrexátu nebo fludarabinu na toxicitu v naší kohortě však nelze s ohledem na charakter sledování, který by jinak vyžadoval zajistit početnější a také kontrolní skupiny pacientů bez aplikace metotrexátu nebo fludarabinu, což prakticky nelze realizovat.

Podle pozorování v této práci byla v případě FLU/MEL protokolu zastižena významně zvýšená incidence MDU u žen, jak bylo pozorováno také při sledování u souborů autologně transplantovaných po přípravě s melfalanem 200mg/m² nebo „BEAM“ (10) nebo při léčbě 5-fluorouracilem (52). Dále byla tendence k vyšší incidenci MDU u pacientů s nižším body mass indexem (BMI). Za těmito faktory se však může skrývat vliv vyšší obdržené dávky melfalanu na kilogram tělesné hmotnosti, když u pacientů se stejným tělesným povrchem bude absolutní aplikovaná dávka melfalanu vždy stejná (140mg/m²), ale pacienti s nižší hmotností, respektive nižším BMI (většinou ženy) musí zákonitě obdržet více mg melfalanu vztahované na kilogram hmotnosti. Tento vliv dávky byl prokázán i v našem souboru v univariantsní analýze, kde výskyt MDU koreloval statisticky signifikantně s vyšší dávkou melfalanu na kilogram hmotnosti (< 3,5 vs. ≥ 3,5mg/kg).

Stejně jako Woo et al. (47) bylo pozorováno delší přetrvávání MDU u pacientů s těžkou formou MDU (st. WHO 2-4) nebo u pacientů následně postižených GVHD. U poloviny pacientů s MDU přetrvávající v den 21 a déle po transplantaci byla přítomna situace, kdy se při stále trvající MDU současně rozvinula i akutní GVHD s mediánem nástupu v den 20 (15 - 30). Na druhé straně, obecná incidence akutní GVHD byla významně vyšší u pacientů s prolongovanou MDU. Multivariantsní analýza pak prokázala významnou závislost akutní GVHD na tíži a prolongovanosti MDU. Tato pozorování ukazují na blízkou provázanost procesů hrajících roli při patogenezi MDU i akutní GVHD, kdy časná GVHD může podporovat perzistenci původně toxické mukozitidy a naopak prolongovaná MDU dále zvyšuje riziko akutní GVHD (47, 54).

Bohužel, z běžného klinického pohledu izolovaného čistě na dutinu ústní, a ani histologickou verifikací, není možné jednoznačně odlišit etiologii postižení dutiny ústní u těchto případů, kdy se prakticky ještě neodezdnělá MDU překrývá s již aktivní akutní GVHD probíhající u pacienta, a navíc MDU prolongovaná nad den +21 po transplantaci byla pozorována také po autologních transplantacích (10, 43) bez výskytu GVHD. Odlišení etiologie postižení dutiny ústní v těchto případech lze

považovat za přínosné v případě studií sledujících efekt medicínských nebo ošetrovatelských postupů v profylaxi a terapii MDU nebo akutní GVHD. V běžné klinické praxi nemá rozlišení MDU nebo GVHD dutiny ústní v době tři týdny po transplantaci zásadní vliv na probíhající celkovou léčebnou strategii a navíc o zahájení léčby akutní GVHD rozhodují především projevy postižení kůže, jater a střeva a nikoliv dutiny ústní, která navíc při akutní GVHD nebývá zasažena izolovaně – narozdíl od případů při chronické GVHD.

Při pouze izolovaném pohledu do dutiny ústní může být problematické i rozlišení zda jde o postižení akutní nebo chronickou GVHD. Základní problémy pacienta, jako je dyskomfort, bolest a suchost dutiny ústní lze zastihnout u obou forem GVHD. Makroskopické změny byly rovněž většinou obdobné a to včetně lichenoidních změn, které byly patrné v našem souboru nejčastěji bukalně u pacientů s aktivní chronickou, ale i akutní GVHD. V literatuře jsou lichenoidní změny uváděny jako charakteristický rys chronické GVHD dutiny ústní a údaje o charakteristikách akutní GVHD v dutině ústní jsou naprosto ojedinělé (53). Snad částečně spolehlivějším vodítkem v klinickém odlišení akutní a chronické GVHD dutiny ústní by mohla být přítomnost velmi intenzivních lichenoidních změn v několika regionech dutiny ústní a dále nález hyperkeratózy, který byl zde v kohortě zastižen jen u chronické GVHD – nicméně zcela výjimečně a snad i z důvodu včasných záchytů GVHD reakcí a zahájení patřičné imunosupresivní léčby bránící progresi postižení do těžkých forem.

Pouze podle histologického obrazu a bez znalosti klinického kontextu také není odlišení akutní a chronické GVHD dutiny ústní možné. Histologické nálezy byly v našem souboru velmi podobné jak u případů, které byly na základě klinického obrazu klasifikovány jako akutní (4 vzorky), tak i u chronických GVHD (8 vzorků). Nebyla patrna mikroskopická kritéria pro jejich rozlišení. Výrazný edém subepiteliálního vaziva s extravazátami erytrocytů, jako známka akutního průběhu, byl patrný v jednom případě chronické GVHD, což však může znamenat i akutní exacerbaci chronického procesu. Histologicky jsme jinak typicky nacházeli "interface dermatitis" a apoptózy a včetně satelitních nekróz. Výraz "interface dermatitis" používáme v kontextu s dutinou ústní jako terminus technicus převzatý z problematiky kůže, protože pregnantně popisuje mikroskopický nález a je v histopatologické praxi zažitý (s vědomím, že výraz dermatitis není ve vztahu k dutině ústní zcela na místě). V 50% případů všech GVHD byly eosinofily ve stromatu, což někteří autoři považují za znak svědčící spíše pro alergický původ,

není však specifický (56). Pouze v 1 případě chronické GVHD byly eosinofily markantní. Odštěpení epitelu od subepiteliálního pojiva (tzv. cleavage) jsme, na rozdíl od Soares et al (48), neprokázali. Slinné žlázy byly zachyceny ve 4 z 12 vzorků (33%), obsahovaly fibrózu, atrofii acinů a zánětlivý infiltrát. Soares et al (48) upozorňují na diagnostický význam postižení slinných žláz, které je častější a výraznější než postižení okolní sliznice.

Diferenciální diagnóza GVHD v kůži a podobně i v ústní dutině zahrnuje zejména toxické či alergické lékové reakce a virové infekce, dále lichen ruber planus a lichenoidní reakci na protézu. U pozdních forem chronické GVHD v kůži se vyvíjí fibróza histologicky neodlišitelná od systémové sklerózy, kterou jsme neidentifikovali v žádném případě GVHD v ústní sliznici (56). Připomínáme, že histologické změny u GVHD v ústní dutině nejsou patognomické. Podobně ani v kůži, s níž jsou u těchto pacientů větší diagnostické zkušenosti, nemůže být GVHD diagnostikována výlučně histologicky, ale mikroskopický nález má být hodnocen vždy v kontextu klinického obrazu a laboratorních výsledků.

Odlišení zda postižení dutiny ústní souvisí s akutní nebo chronickou GVHD může být opět přínosné pro studie sledující incidenci a charakter těchto komplikací u transplantovaných pacientů. Správné posouzení postižení dutiny ústní může mít vliv i při rozhodování o léčbě chronické GVHD, kdy s ohledem na intenzitu a extenzitu projevů bývá upravována medikace (41, 55).

Postižení sliznic dutiny ústní v rámci akutní GVHD bylo u FLU/MEL a BU/CY2/±ATG režimu prakticky minimální a srovnatelné v četnosti do 8%. Pakliže bychom přiřadili i výše zmiňované pacienty s překrývající se MDU a akutní GVHD, pak by tato incidence vzrostla, ale to by byla již spekulace.

Postižení dutiny ústní chronickou GVHD mělo v této kohortě FLU/MEL pacientů nižší incidenci (29%), než bylo popisováno v případě poměrně širokého sledování po alogenní transplantaci krvetvorných buněk (n=147) u Busca (30), kde incidence dosahovala až 54%. Do Buscova souboru byly ale zařazeni pacienti bez ohledu na protokol předtransplantační přípravy a doba sledování byla výrazně delší s mediánem 1792 (964-4374) dní ve srovnání s našimi 346 (6-1230) dny, což ztěžuje možnost srovnání. Lze předpokládat, že v případě delšího sledování by ještě incidence v našem souboru mohla narůst. V Buscově souboru se při mediánu rozvoje v den 148 objevovala chronická GVHD dutiny ústní až do dne 925 a v našem souboru se případ objevil zatím nejdéle v den 540 po transplantaci. V každém

případě lze i tak považovat výskyt postižení pacientů chronickou GVHD v dutině ústní po FLU/MEL přípravě za významný.

U většiny FLU/MEL pacientů s GVHD dutiny ústní se jednalo o mírnější postižení (st. 1 dle NIH) doprovázené především pocitem suchosti sliznic, dyskomfortem až bolestí, nicméně bez omezeného perorálního příjmu. Obtíže však měly poměrně protrahované trvání s mediánem 135 (11-665) dní a pacienti je vnímali vesměs negativně.

Makroskopicky byly v 96% případů GVHD dutiny ústní pozorovány lichenoidní změny sliznice v bukalní oblasti, jak u akutní tak i chronické GVHD, a v celkem 12 reprezentativních vzorcích odebraných k histologickému ověření u pacientů s GvHD dutiny ústní (4x klinicky akutní GvHD, 8x chronická GvHD) byl popsán plně odpovídající patologický korelát, tedy nález satelitních nekrotických a lymfocytárních, resp. „interface inflammation“, a to jak u chronické tak u akutní formy GVHD. Diverzita T-lymfocytární populace popisovaná některými autory (48, 49, 50) v infiltrátu nemá zcela jasný význam. Může jít o rozdílnost danou metodikou imunohistochemie, velikostí sledovaných souborů nebo fází GVHD (48) - pro klinickou praxi však tato problematika není důležitá.

2.6. Závěr:

Práce charakterizovala klinické a morfologické projevy dutiny ústní v rámci MDU a akutní a chronické GVHD u pacientů po alogenní transplantaci krevetvorných buněk se zaměřením na protokol FLU/MEL, u kterého podobná problematika doposud nebyla takto vůbec zpracována.

Práce přinesla informace o histologických rysech akutní GVHD v oblasti dutiny ústní, přičemž tomuto tématu rovněž není v literatuře prakticky věnována pozornost.

Bylo zaznamenáno zřetelné prolínání makroskopických a histologických charakteristik v případě chronické i akutní GVHD dutiny ústní, což není v dostupné literatuře zvlášť zmiňováno.

Odlišení akutní nebo chronické GVHD dutiny ústní vyžaduje zhodnocení GVHD aktivity a klinicko-patologického obrazu u pacienta jako celku. Izolovaný morfologický makroskopický a histologický nález může být obdobný u obou forem postižení.

Protokol FLU/MEL lze považovat stejně jako BU/CY2/±ATG za vysoce toxický pro oblast dutiny ústní. Protokol FLU/CY takový potenciál nemá.

Těžké formy orální GVHD jsou po FLU/MEL ojedinělé, ale s ohledem na délku přetrvávání i nižších stupňů postižení se jedná o klinicky významný problém.

Podrobná charakteristika MDU a GVHD u významných protokolů hematologické léčby a individuálních rizikových faktorů má význam pro hledání postupů omezujících toxicitu a pro definování výrazně ohrožených skupin pacientů, kteří by mohli profitovat z cílených léčebných a především profylaktických postupů.

2.7. Seznam použité literatury:

1. Raber-Durlacher J, Barasch A, Peterson E. et al. Oral Complications and management considerations in patients treated with high-dose cancer chemotherapy. *Supportive Cancer Therapy* 2004: 1, 219-229.
2. Sonis S, Oster G, Fuchs H et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2001: 19, 2201-2205.
3. Bellm LA, Epstein JB, Rose-Ped A et al. Patients reports of complications of bone marrow transplantation. *Support Care Cancer* 2000: 8, 33-39.
4. Sonis S. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004: 4, 277-284.
5. Moss SF, Wright NA. Molecular aspects of mucosal repair: a summary (comment). *J Biol Med* 1996: 69, 155-158.
6. Blijlevens N, Donnelly JP, De Pau BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant* 2000: 25, 1269-1278.
7. Ruescher TJ, Sodeifi A, Scrivani SJ et al. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Cancer* 1998: 82, 2275-281.
8. Donnelly JP, Dompeling EC, Meis JF et al. Bacteremia due to oral viridans streptococci in neutropenic patients with cancer: cytostatics are a more important risk factor than antibacterial prophylaxis. *Clin Infect Dis* 1995: 20, 469-4670.
9. Donnelly JP, Bellm LA, Epstein JB et al. Antimicrobial therapy to prevent or to treat oral mucositis. *Inf Dis* 2003: 3, 405-412.
10. Vokurka S, Bystricka E, Koza V et al. The comparative effects of povidone-iodine and normal saline mouthwashes on oral mucositis in patients after high-dose chemotherapy and APBSCT—results of a randomized multicentre study. *Support Care Cancer* 2005: 13, 554-558.

11. Rubenstein E, Peterson D, Schubert M et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 2004; 100, 2026-2046.
12. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90, 3204-3213.
13. Beelen DW, Elmaagacil A et al. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 1999; 93, 3267-3275.
14. Woo SB, Sonis ST, Monopoli MM et al. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer* 1993; 72, 1612-1617.
15. Popescu RA, Norman A, Ross PJ et al. Adjuvant or palliative chemotherapy for colorectal cancer in patients 70 year or older. *J Clin Oncol.* 1999; 17, 2412-2418.
16. Ulrich C, Yasui Y, Storb R et al.: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001; 98, 231 – 234.
17. Kuilenburg A, Haasjes J, Richel D et al.: Clinical Implications of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency in Patients with Severe 5-Fluorouracil-associated Toxicity: Identification of New Mutations in the *DPD* Gene. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6, 4705.
18. Chen E. Impact of Addison's disease and psoriasis on the frequency of oral mucositis. Thesis. Harvard School of Dental Medicine, 2003.
19. Bolwell BJ, Kalaycio M, Sobecks R et al., A multivariable analysis of factors influencing mucositis after autologous progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30, 587-591.
20. Robien K, Schubert M, Bruemmer B et al., Predictors of Oral Mucositis in Patients Receiving Hematopoietic Cell Transplant for Chronic Myelogenous Leukemia. *JCO* 2004; 22, 7, 1268-1275.
21. Raber-Durlacher JE, Weijl NI, Abu Saris M et al., Oral mucositis in patients treated with chemotherapy for solid tumors: a retrospective analysis of 150 cases. *Support Care Cancer*, 2000; 8, 366-71.

22. Montserrat VL, Sonis S, Oster G. Burden of oral mucositis and/or esophagitis in patients undergoing radiation treatment for head and neck cancer or non-small cell lung cancer. *JCO*, 2004: 22, 8104.
23. McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol* 1998: 34, 484-90.
24. Rapoport AP, Miller Watelet LF, Linder T et al. Analysis of Factors that correlate with Mucositis in Recipients of Autologous and Allogeneic Stem-Cell Transplant. *JCO* 1999: 17, 2446-2453.
25. Branda RF, Naud SJ, Brooks EM et al. Effect of vitamin B12, folate, and dietary supplements on breast carcinoma chemotherapy induced mucositis and neutropenia. *Cancer* 2004: 100, 1058-64.
26. Sonis ST, Elting LS, Keefe D et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004: 1009, 1995-2025.
27. Dodd MJ, Miskowski C, Shiba GH et al. Risk factors for chemotherapy-induced oral mucositis: dental appliances, oral hygiene, previous oral lesions, and history of smoking. *Cancer Invest* 1999: 17, 278-84.
28. Devergie A. Graft versus host disease. In *The EBMT Handbook – Haematopoietic stem cell transplantation*, 2008, p.219-234..
29. Treister NS, Woo SB, O'Holleran EW, Lehmann LE, Parsons SK, Guinan EC. Oral chronic graft-versus-host disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Sep 2005: 11, 721-731.
30. Busca A, Locatelli F, Vai S, Dall'Omo AM, Gargiulo A, Falda M. Clinical grading of oral chronic graft-versus-host disease in 104 consecutive adult patients. *Haematologica*, 2005: 90, 567 - 569.
31. Lee S, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*, 2002: 100, 406-414.
32. Flowers M, Parker P, Johnston L, Matos A et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*, 2002: 100, 415-419.
33. Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*, 2002: 100, 2374-2386.

34. Ljungman P, Gratwohl A. Indications and current practice for allogeneic and autologous HSCT for haematological diseases, solid tumors and immune disorders. In *The EBMT Handbook – Haematopoietic stem cell transplantation*, 2008.
35. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, et al. Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 30, 813-831.
36. Giralt S, Thall PF, Issa K, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood*. 2001; 97, 631-637
37. Kröger N, Sayer H, Schwerdtfeger R et al. Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood*, 2002; 100, 3919 - 3924.
38. Inamoto Y, Oba T, Miyamura K et al. Stable engraftment after a conditioning regimen with fludarabine and melphalan for bone marrow transplantation from an unrelated donor. *Int J Hematol*, 2006; 83, 356-362.
39. Anderlini P, Saliba R, Acholonu S et al. Fludarabine-melphalan as a preparative regimen for reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma: the updated M.D. Anderson Cancer Center experience. *Haematologica*, 2008; 93, 257-264.
40. Aisa Y, Mori T, Kudo M et al. Oral cryotherapy for the prevention of high-dose melphalan-induced stomatitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer*, 2005; 13, 266-269.
41. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005;11, 945-956.
42. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 1974; 18, 295-304.
43. Blijlevens N, Schwenkglenks M, Bacon P et al. Prospective Oral Mucositis Audit: Oral Mucositis in Patients Receiving High-Dose Melphalan or BEAM Conditioning Chemotherapy—European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26, 1519-1525.

44. Cutler C, Laglenne P, Ford C et al. Oral Mucositis Incidence and Severity after Methotrexate and Non-Methotrexate Containing GVHD Prophylaxis Regimens. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004; 104: 351.
45. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 621-625.
46. Bensinger W, Schubert M, Ang KK. Task Force Report. prevention and management of mucositis in cancer care. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6: Suppl 1: 1-21.
47. Woo SB, Sonis ST et al. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer*, 1993: 72, 1612-1617.
48. Soares AB, Faria PR, Magna LA et al. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med*, 2005: 34, 368-373.
49. Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A, G Dahllof et al. A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. *Arch Oral Biol*, 1992: 37, 539-547.
50. Hasseus B, Jontell M, Brune M, Johansson P, Dahlgren UI. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. *Scand J Immunol*, 2001: 54, 516-524.
51. Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M et al. Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1996: 82, 556-563.
52. Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1165-1171.
53. Chor A, Sotero Caio AB, de Azevedo AM. The irreplaceable image: Amelioration of oral mucosal lesions of acute graft-versus-host disease by low-level laser therapy. *Haematologica*, 2001: 86, 1321.
54. Brennan M, Bültzingslöwen I, Schubert M, Keefe D. Alimentary Mucositis: putting the guidelines into practice. *Support Care Cancer* 2006: 14, 573-579.

55. Standardní operační postup (SOP) č.121A/01 Nemoc z reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) – léčba chronické GVHD, Hematologicko-onkologické oddělení Fakultní nemocnice v Plzni, 2008.

56. McKee P, Calonje E, Granter S. Lichenoid and Interface Dermatoses - GVHD. In Pathology of the Skin with Clinical Correlations, third edition. Elsevier Mosby 2005, p.250 – 255.

2.8. Summary:

In this thesis section “Oral Mucositis (OM) and oral Graft versus Host Disease (GVHD) in patients after allogeneic stem cells transplantation and with focus to FLU/MEL conditioning regimen” the author deals with following issues:

- 1. Literature overview:** The overall negative impact of OM is mentioned and the complex pathogenesis, clinical characteristics, incidence and factors influencing both OM and GVHD are described. The histological features of GVHD and classification of it are mentioned, too. Conventional and reduced-intensity conditioning transplant regimens, including FLU/MEL are presented.
- 2. Methodological section:** Prospective observational study of 117 patients after allogeneic stem cells transplantation with BU/CY2/±ATG (26%), FLU/MEL (60%), FLU/CY (9%), Bu/FLU/ATG (2%) and HD-CY/ATG (2%) conditioning regimens. OM assessed according to WHO criteria, GVHD assessed according to NIH criteria accepted by the EBMT. The statistical univariate analysis performed by means of GraphPad In Stat - Statistica Software (Mann-Whitney, Fisher, t-test), $p < 0,05$ considered significant. Multivariate analysis used in OM risk factors assessment.
- 3. Results:** The OM incidence was significantly dependent on pre-transplant conditioning regimen (Bu/CY2/±ATG: 100%, FLU/MEL: 78%, FLU/CY: 9%, $p = 0,0001$) in multivariable analysis. OM kinetics and severe OM (gr.3-4 WHO) were comparable in FLU/MEL vs. Bu/CY2/±ATG. In FLU/MEL patients, OM more often observed in women compared to men (89% vs. 67%, $p = 0,04$) and in patients with lower body mass index (26 (14-39) vs. 28 (17-43), $p = 0,01$). Incidence of acute GVHD was significantly higher in patients with OM persisting over day +21 post-transplant (68% vs. 32%, $p = 0,005$) and logistic regression proved significant dependence of acute GVHD on severity and duration of OM ($p = 0,04$). In FLU/MEL, acute oral GVHD was observed in 8%

of patients with onset in median of day 85 (40-140) post-transplant and with duration of 24 (7-54) days, the bucal mucosa was affected in 100% and lichenoid changes observed in 83% patients. In FLU/MEL, chronic oral GVHD was observed in 29% of patients with onset in median of day 230 (107-540) post-transplant and with duration of 133 (7-54) days, the bucal mucosa was affected in 100% and lichenoid changes observed in 100% patients. In 14/27 FLU/MEL patients histology of bucal mucosa presenting clinically with lichenoid features (4 cases acute and 8 chronic GVHD) was analyzed, in 100% samples the apoptotic bodies and interface inflammation was observed. No specific characteristic features were found in acute and chronic GVHD.

- 4. Conclusions:** Characteristics of OM and oral GVHD were analyzed in patients after allogeneic stem cells transplantation and the FLU/MEL conditioning regimen was in focus. The FLU/MEL and BU/CY2/±ATG posses high oral-toxicity potential, contrary to FLU/CY. Severe oral GVHD is rare in FLU/MEL patients, however, with respect to long-time duration of the complication this can be considered as clinically significant problem. It can be complicated to distinguish acute and chronic GVHD if not assessed in holistic clinical context – morphological and histological features are similar in both forms of GVHD. Lichenoid changes were observed both in acute and chronic oral GVHD in this cohort of patients, which stays in contrast to literature data where lichenoid changes are considered significant for chronic GHVD. Curiously, literature describing oral GVHD features is remarkably rare.

3. Kaposiho sarkom po alogenní transplantaci periferních krvevorných buněk – raritní sekundární neoplázie.

3.1. Přehled o současném stavu problematiky

Kaposiho sarkom (KS) se manifestuje v podobě hyperpigmentovaných, až sytě fialových kožních papul a plaků. Postihovat může i sliznici dutiny ústní, gastrointestinální trakt, lymfatické uzliny a plíce. Histologicky je reprezentován proliferací neoplastických větvenitých endotelií vytvářejících šterbinovité prostory s erythrocyty. V patologické tkáni jsou pak pravidelně detekovány sekvence DNA lidského herpetického viru 8 (Human herpesvirus 8, HHV-8), který je mimo jiné zodpovědný za kódování genů stimulujících angiogenezu. Studie klonality navíc odhalují monoklonální i polyklonální rysy (1,2,3,4). Řada faktorů a interakcí může hrát roli v patofyziologii – např. glukokortikoidy podporují růst buněčných linií KS (5) a souběžně probíhající infekce nejspíše také mají význam (1,15,16). Spontánní regrese KS se objevují, zvláště u iatrogeního podtypu sarkomu u pacientů léčených imunosupresivou a po transplantacích orgánů. Prevalence KS u pacientů po transplantaci ledvin se blíží 4% (6). Po transplantacích krvevorných buněk je raritní, ačkoliv HHV-8 séropozitivita je i zde obecně vysoká - 12% kanadských a 18% francouzských pacientů (7,8). Doposud, podle dostupných literárních sdělení, bylo popsáno do deset případů KS po alogenní transplantaci krvevorných buněk a v České republice se jedná o první takový případ (9,10,11,12,13).

3.2. Cíl práce

Popsat klinicko-patologické charakteristiky raritní sekundární neoplázie po alogenní transplantaci krvevorných buněk.

3.3. Metodika zpracování

Kazuistika pacientky s nově diagnostikovanou akutní B-lymfoblastickou leukémií s přítomností Ph-1 chromozómu a pozitivitou fúzního genu BCR-ABL v době od 2/2004 na Hematologicko-onkologickém oddělení FN v Plzni. Zpracování tkáně sarkomu na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu v Plzni histologicky a molekulárně-geneticky PCR analýzou tkáně na průkaz DNA sekvencí HHV-8 viru s použitím primeru Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV-1: 5'-

AGCCGAAAGGATTCCACCAT-3' a KSHV-2: 5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3'). Stanovení populací CD-4, CD-8, CD-19, CD-16 a CD56 pozitivních lymfocytů v periferní krvi průtokovou cytometrií (FACS) na Hematologicko-onkologickém oddělení FN v Plzni.

3.4. Výsledky:

V 2/2004 byla na Hematologicko-onkologickém oddělení FN v Plzni u jinak zdravé, 58-leté a HIV negativní pacientky diagnostikována akutní B-lymfoblastická leukémie s přítomností Ph-1 chromozómu a pozitivitou fúzního genu bcr-abl. Indukční léčbou (prednison, vinkristin, idarubicin) bylo dosaženo hematologické kompletní remise. V 4/2004 po přípravě s redukovanou intenzitou podle protokolu FLU/MEL (fludarabin 30mg/m² v den -5 až -2, melfalan 140mg/m² v den -1) podstoupila pacientka transplantaci periferních krvetvorných buněk od HLA-identického bratra. Kompletní molekulární remise a plný dárcovský chimérismus byl dosažen ve 30. dni (den +30) od transplantace. Pro rozvoj akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) s postižením kůže, st. II dle Glucksberga, bez histologické verifikace, byla ode dne +23 po transplantaci doplněna původní imunosupresivní léčba s cyklosporinem A o metylprednisolon v dávce 2mg/kg/den s postupnou redukcí v následném období. V den +120 byla léčba cyklosporinem A ukončena a dávka kortikoidu v té době již snížena na 4mg ob den. Následně pro nový rozvoj histologicky verifikované GVHD od dne +140 s postižením kůže, střevní sliznice a jater byla původní kombinovaná imunosuprese opět ode dne +150 plně obnovena. V potransplantačním období do dne +160 proběhly opakované infekční komplikace včetně invazivní aspergilové plicní infekce a enterokolitidy s pozitivitou Clostridium difficile, Pseudomonas aeruginosa, methicilin-rezistentního Staph. aureus (MRSA) a Candida albicans a celkem 5x byla metodikou PCR-DNA prokázána reaktivace cytomegalovirové (CMV) infekce s dosažením clearance viru při preempeptivní léčbě s ganciclovirem nebo foscavirem.

V průběhu dní +90 až +120 se postupně na končetinách, trupu a hlavě pacientky rozvinuly, vedle již přítomných petechií a sufúzí, vícečetné tmavší, až sytě fialové, nebolestivé, 3-10mm veliké papuly s hladkým lesklým povrchem. Histologické vyšetření nodulu prokázalo proliferaci vřetenitých, atypických endotelií s přítomností PAS pozitivních globulů, přítomnost abnormálních cév, depozita hemosiderinu a

extravazáty erytrocytů. Molekulárně-geneticky PCR analýzou byly v tkáni prokázány DNA sekvence HHV-8 viru s použitím primeru Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (14). Hladiny imunoglobulinů pacientky se v té době pohybovaly na hodnotě IgG 4,0 g/l, IgA 0,3 g/l and IgM 0,2 g/l. Počet CD4 pozitivních lymfocytů (T-helper) byl 133/uL, CD8 (T-suppressor) 93/uL, CD-19 (B-cells) 8/uL, CD-16 a CD-56 (NK cells) 78/uL.

V období dní +180 až 350 byla vybraná ložiska KS na hlavě a končetinách ošetřována bariovým laserem (595nm, Candela) s efektem v podobě částečné regrese ošetřovaných ložisek. Přibližně ode dne +270, kdy již nedošlo k výskytu žádné významné infekce a imunosupresivní léčba s metylprednisolonem byla redukována na 4mg ob den, začalo docházet k pozvolné spontánní regresi KS. Počet CD4 pozitivních lymfocytů (T-helper) se pohyboval nad 240/uL. Od dne +390 zůstaly v místě původních postižení již jen reziduální pigmentace. V den +1500 (respektive 4,2 roku po transplantaci) v červnu 2008 přetrvává u pacientky kompletní remise ALL a KS.

3.5. Diskuze:

Diagnóza Kaposiho sarkomu u naší pacientky je s ohledem na klinicko-patologické charakteristiky jednoznačná. Vedle těžké potransplantační imunodeprivace, jako potenciálně primární příčiny podporující rozvoj KS, zde stojí za povšimnutí především souběh manifestace KS s výskytem závažných infekcí, včetně CMV, které mohou podle některých autorů (1,15,16) pravděpodobně potencovat vývoj tohoto sarkomu, např. podporou aktivity viru HHV-8. Nicméně v tomto případě může souběh manifestace KS se závažnými infekcemi (včetně opakované reaktivace CMV) vyplývat právě z těžkého imunodeficitu u této pacientky s ALL, po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a GVHD postižením vyžadujícím kombinovanou imunosupresivní léčbu a dlouhodobé užívání kortikoidu. A naopak, KS regredoval, stejně jako se již neobjevily závažné infekce až s odstupem řady měsíců po transplantaci při vysazování imunosupresiv. Sérum pacientky ani dárce nebylo testováno na přítomnost HHV-8 DNA sekvencí nebo HHV-8 protilátek a tak cesta přenosu viru HHV-8 (štěp, transfúze nebo endogenní reaktivace) zůstává neznáma. Příklad podporuje pozorování, která neprokázala efekt antivirové léčby

s ganciclovirem nebo foscavirem na potlačení sarkomu u transplantovaných pacientů, i když tato virostatika inhibují replikaci viru HHV-8 in vitro (1).

3.6. Závěr:

V souladu s cílem práce bylo upozorněno na případ raritní sekundární neoplázie po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a byla popsána klinicko-patologická charakteristika tohoto individuálního případu. Sledování dalších případů pacientů s KS po transplantacích a podpora výzkumu etiopatogeneze a epidemiologie jsou nadále nezbytné pro bližší pochopení podstaty této komplikace.

3.7. Seznam použité literatury:

1. Francés C.: Kaposi's sarcoma after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13;2768-2773.
2. Moosa MR.: Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients: a 23-year experience. *QJM* 2005;98;205-214.
3. Delabesse E., Oksenhendler E., Lebbe C et al.: Molecular analysis of clonality in Kaposi's sarcoma. *J Clin Pathol* 1997;50;664-668.
4. Rabkin CS, Bedi G, Musaba E et al.: AIDS-related Kaposi's sarcoma is a clonal neoplasm. *Clin Cancer Res* 1995;1;257-260.
5. Cai J, Zheng T, Lotz M et al.: Glucocorticoids induce Kaposi's sarcoma cell proliferation through the regulation of transforming growth factor-beta. *Blood* 1997;89;1491-1500.
6. Cattani P, Capuano R, Raffeo R et al.: Kaposi's sarcoma associated with previous human herpesvirus 8 infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2001;39;505-508.
7. Sergerie Y, Abed Y, Roy J et al.: Comparative evaluation of three serological methods for detection of human herpesvirus 8-specific antibodies in Canadian allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004;42;2663-2667.
8. Rosenzweig M, Fery N, Bons V et al.: Human herpesvirus-8 (HHV8) serology in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999;24;351-354.
9. Medeiros BC, Rezuke WN, Ricci A et al.: Kaposi's sarcoma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Acta hematol* 2000;104;115-118.
10. Helg C, Adatto M, Salomon D et al.: Kaposi's sarcoma following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994;14;999-1001.

11. Erer B, Angelucci E, Muretto P et al.: Kaposi's sarcoma after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997;19;629-631.
12. Bruno B, Sorasio R, Barozzi P et al.: Kaposi's sarcoma triggered by endogenous HHV-8 reactivation after non-myeloablative allogeneic hematopoietic transplantation. *Eur J Haematol* 2006;76;358-359.
13. Palencia S, Rodriguez-Peralto J, Castano E et al.: Kaposi's sarcoma after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Intern J Dermatol* 2003;42;647-649.
14. Serfling U, Lukowsky A, Audring H et al.: Search for Kaposi's sarcoma-associated virus DNA in hemangioproliferative disorders and cutaneous malignant lymphoma. *J Cutan Pathol* 1997;24;298-304.
15. Sleiman C, Mal H, Roue C et al.: Bronchial Kaposi's sarcoma after single lung transplantation. *Eur Respir J* 1997;10;1181-1183.
16. Siegal B, Levinton-Kriss S, Schiffer A et al.: Kaposi's sarcoma in immunosuppression. Possibly the result of a dual viral infection. *Cancer* 1990;65;492-498.

3.8. Summary

Kaposi's sarcoma after allogeneic peripheral stem cell transplantation – rare secondary neoplasia.

The iatrogenic subtype of Kaposi's sarcoma (KS) is predominantly observed in renal transplant patients. Its occurrence after stem cell transplantation is extremely rare. In a 58-year-old woman with B-ALL, the KS had developed in the period of days +90-120 after sibling donor allogeneic peripheral stem cell transplantation. The KS presented as multitude 3-5mm papules of dark blue, purplish color. Histologically, haphazardly oriented fascicles of spindled cells separated by irregular vascular lumina or slit-like vessels and rare hyaline PAS-positive globules were identified. HHV-8 DNA sequences were detected by PCR-primers KSHV-1 and KSHV-2. The onset of KS in the patient correlated with CMV reactivations, suggesting that perhaps CMV infections could aggravate it. Treatment with ganciclovir and foscavir did not result in KS regression. The KS spontaneously and gradually regressed within days +270-390 post-transplant, when no CMV or any other clinically important infection was evident, and immunosuppressive treatment was reduced. Further observations of KS and HHV-8 after organ transplantation are necessary to help understand the nature of this complication.

4. Příloha – vzdělávací a vědecké aktivity autora ve vztahu k tématu dizertace

Výuka:

1. Od 2/2006: Vysoká škola v Plzni, o.p.s., studium bakalářských a zdravotnických oborů, katedra ošetrovatelství, předmět onkologie.
2. 10-11/2008: Certifikovaný kurz „Ošetrovatelská péče v hemato-onkologii“, FN Plzeň, Hemato-onkologická onemocnění, diagnostika, léčebné postupy, komplikace pacientů.

Monografie:

1. Vokurka S, et al. Ošetrovatelské problémy a základy hemoterapie – učební texty a ošetrovatelské problémy nejen pro sestry z oboru hematologie a onkologie. Galén, 2005.

Přednášky:

1. II.Hematologický seminář EDIPO, sestry, 15.-17.6.2001, Špičák. Extravazace a flebitidy po chemoterapii. Poškození sliznice dutiny ústní hemato-onkologických pacientů.
2. V.Hematologický seminář EDIPO, sestry, 1.-3.10.2004, Červená n.Vltavou. Mukositida dutiny ústní po chemo/aktinoterapii v r.2004.
3. 21st meeting of the EBMT Nurses Group, 20.-23.3.2005 Prague. Oral mucositis in patients after autoSCT – results of randomised multicentre study comparing povidone-iodine versus normal saline mouthwashes.
4. 21st meeting of the EBMT Nurses Group, 20.-23.3.2005 Prague. Mucositis.
5. VI. Hematologický seminář EDIPO, sestry, 7.-9.10.2005, Červená n.Vltavou. Rizikové faktory mukositidy dutiny ústní.
6. 22nd. meeting of the EBMT Nurses Group, 19.-22.3.2006, Hamburg. Characteristics of oral mucositis in patients after autologous stem cell transplantation and related risk factors – a new study proposals.
7. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 2.6.2006, Olomouc. Mukositida dutiny ústní po vysocedávkované chemoterapii s transplantací krevetvorných buněk - současný stav, možnosti ovlivnění a výzvy do budoucna.
8. VII. Hematologický seminář EDIPO, sestry, 14.-15.9.2006 Červená n.Vltavou. Mukositida-rizikové faktory.
9. XXII.Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 29.5.2008, Olomouc. Významná slizniční toxicita v oblasti dutiny ústní v rámci alogenních transplantací krevetvorných buněk po nemyeloablativní přípravě fludarabinem a melphalanem.

Články:

1. Vokurka S., Bystricka E., Koza V. et al., The comparative effects of povidone-iodine and normal saline mouthwashes on oral mucositis in patients after high-dose chemotherapy and APBSCT—results of a randomized multicentre study. Support Care Cancer, 2005, 13, 554-558.

2. Bystřická E., Vokurka S., Porovnání efektu výplachů u mukositivity dutiny ústní. *Sestra* 1, 2006, p.43.
3. Vokurka S., Bystricka E., Koza V. et al., Higher incidence of chemotherapy induced oral mucositis in females: a supplement of multivariate analysis to a randomized multicentre study. *Support Care Cancer*, 2006, vol. 14, 9, 974-976.
4. Vokurka S. Mukozitida dutiny ústní a gastrointestinálního traktu u pacientů po chemoterapii – aktuální přehled. *Klinická Onkologie* 2007, vol. 20, No.1, 23 – 28.
5. Vokurka S., Kazakov D., Koza V., Pzinger K., Vozobulová V., Švojgrová M. Kaposiho sarkom po alogenní transplantaci periferních krvetvorných buněk s nemyeloablativní přípravou – kazuistika. *Trans Hemat dnes* 2007, vol.13, No.1, 32-34.
6. Nicole Blijlevens, Matthias Schwenkglenks, Pamela Bacon, Alessandra D'Addio, Hermann Einsele, Johan Maertens, Dietger Niederwieser, Werner Rabitsch, Ann Roosaar, Tapani Ruutu, Harry Schouten, Rebecca Stone, Samuel Vokurka, Barry Quinn, and Shaun McCann. Prospective Oral Mucositis Audit: Oral Mucositis in Patients Receiving High-Dose Melphalan or BEAM Conditioning Chemotherapy--European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. *J Clin Oncol* 2008: vol. 26, No.9.
7. Vokurka S. Mukositida dutiny ústní u pacientů po chemoterapii. *Kompendium ambulantní medicíny - Medical Tribune* 2008, vol.4, No.7

Abstrakta:

1. Bystricka E., Vokurka S., Pavlicovca V., Patorkova M., Scudlova J. ASCT – Proposals for nurses study research EDIPO 2001 (Oral mucositis prophylactic care). *Bone Marrow Transpl.*, 3/2002, vol.29, suppl.2, p.281.
2. Bystricka E., Chvojikova I., Vokurka S., Koza V. Oral mucositis in patients after autoSCT – results of randomised multicentre study comparing povidone-iodine versus normal saline mouthwashes. *Bone Marrow Transplant.*, 3/2005, vol. 35, supplement 2, p 273.
3. Bystricka E., Vrabcova M., Vokurka S., Characteristics of oral mucositis in patients after autologous stem cell transplantation and related risk factors – a new study proposals. *Bone Marrow Transplant.*, 3/2006, vol. 37, supplement 1, p 261.
4. Vokurka S. Mukositida dutiny ústní po vysocedávkované chemoterapii s transplantací krvetvorných buněk - současný stav, možnosti ovlivnění a výzvy do budoucna. *Sborník abstrakt XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí*, 6/2006, abstr. 727, p..51.
5. Vokurka S, Koza V, Kazakov D et al. Kaposiho sarkom po alogenní transplantaci perifereních krvetvorných buněk s nemyeloablativní přípravou. *Sborník abstrakt XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí*, 6/2006, abstr.N15, p123.
6. Bystricka E., Vokurka S., Brandejsova R et al. Oral mucositis risk factors in patients after autologous stem cell transplantation – ongoing prospective and multicentre study. *Bone Marrow Transplant.*, 3/2007, vol. 39, supplement 1, p 275.
7. Vokurka S., Škardová J., Steinerová K. Významná slizniční toxicita v oblasti dutiny ústní v rámci alogenních transplantací krvetvorných buněk po nemyeloablativní přípravě fludarabinem a melfalanem. *Vnitřní lék* 2008, 54 (5), 8.
8. Škardová J., Kabátová-Maxová K., Vokurka S. Nové možnosti ošetřování mukozitivity dutiny ústní u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk. *Vnitřní lék* 2008, 54 (5), 91.