

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE



## Autoreferát disertační práce

MUDr. Alice Sýkorová

Hradec Králové 2005



Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

MUDr. Alice Sýkorová

*Profylakticky podávaná parenterální výživa a suplementace  
glutaminem při transplantaci periferních kmenových  
buněk a kostní dřeně*

Autoreferát disertační práce

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

MUDr. Alice Sýkorová

*Profylakticky podávaná parenterální výživa a suplementace  
glutaminem při transplantaci periferních kmenových  
buněk a kostní dřeně*

*Doktorský studijní program – obor vnitřní lékařství*

Autoreferát disertační práce

Hradec Králové

2005

Disertace byla vypracována v rámci distančního studia v doktorském postgraduálním programu vnitřní lékařství na Katedře interních oborů Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

#### **Uchazeč**

MUDr. Alice Sýkorová

II. interní klinika – oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové

#### **Školitel**

Doc. MUDr. Jiří Horáček, CSc.

II. interní klinika – oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové

#### **Oponenti**

Prof. MUDr. Vladimír Teplan, DrSc. - Klinika nefrologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc. - Hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc

Stanovisko k disertaci vypracovala oborová rada katedry vnitřního lékařství LF UK v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

**Autoreferát byl rozeslán dne 11. 5. 2006**

**Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu všeobecné lékařství v oboru vnitřní nemoci**

**v pondělí dne 12. června 2006 od 11.30 hodin,  
Onkologický pavilon FN v Hradci Králové  
(budova č. 23, třetí podlaží, místnost č. 3.211).**

S disertací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova ul. 870, Hradec Králové.

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu v oboru vnitřní lékařství.

## ***1 Obsah***

<b>1</b>	<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>TEORIE</b> .....	<b>5</b>
2.1	TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK.....	5
2.2	PŘÍČINY A DŮSLEDKY MALNUTRICE U TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK.....	5
2.3	METABOLICKÁ PÉČE U TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK.....	6
2.4	NUTRIČNÍ PODPORA U TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK.....	6
2.5	OSTATNÍ PODPŮRNÁ PÉČE.....	8
2.6	GLUTAMIN.....	9
<b>3</b>	<b>VLASTNÍ PRÁCE</b> .....	<b>19</b>
3.1	ÚVOD.....	19
3.2	CÍL PRÁCE.....	20
3.3	SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA.....	21
3.4	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	25
3.5	VÝSLEDKY.....	26
3.6	DISKUSE.....	39
3.7	ZÁVĚR.....	44
3.8	SEZNAM LITERATURY.....	45
<b>4</b>	<b>SEZNAM PRACÍ AUTORA</b> .....	<b>49</b>
4.1	PŮVODNÍ PRÁCE.....	49
4.2	ABSTRAKTA.....	49
<b>5</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>53</b>

## 2 Teorie

### 2.1 Transplantace krvetvorných buněk

Transplantace periferních kmenových buněk (TPKB) nebo kostní dřeně je léčebnou metodou, která se uplatňuje nejen v hematologii, ale též v léčbě solidních tumorů a v léčbě některých metabolických vrozených onemocnění. Dominující a rozšiřující se indikaci však představují maligní krevní onemocnění (mnohočetný myelom, ne – Hodgkinův lymfom, Hodgkinův lymfom, méně akutní leukemie) (49).

Podle dárce lze transplantace rozdělit na syngenní, alogenní a autologní. U syngenní transplantace je dárce jednovaječné dvojče. Převod kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk (PKB) od jiného člověka se nazývá alogenní transplantace. U autologní transplantace je dárce kostní dřeně nebo PKB sám nemocný (19, 49). U všech druhů transplantace je nutné příjemce připravit k přijetí transplantátu potlačením jeho imunitních mechanismů silnou imunosupresí v tzv. přípravném chemo(radio)terapeutickém režimu. Tak se vytváří prostor pro autologní štěp či štěp dárce. Po převodu štěpu následuje peritransplantační období, ve kterém se může rozvinout řada komplikací. U nemocných autologně transplantovaných dochází k výrazným projevům toxicity přípravného režimu, po alogenní transplantaci je navíc nemocný ohrožen např. vznikem akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) (49).

### 2.2 Příčiny a důsledky malnutrice u transplantace krvetvorných buněk

U hematologicky nemocných se může rozvinout malnutriční stav již v důsledku vlastního onemocnění ještě před přijetím do nemocnice, ale častěji dochází ke vzniku tzv. iatrogení malnutrice až během hospitalizace přímo působením protinádorové léčby. Použití přípravných režimů před transplantací a následně i samotná transplantace vedou často k funkčním a metabolickým změnám organismu, které nemocného ohrožují malnutricí a metabolickým rozvratem (20, 43).

#### 2.2.1 *Mechanismy vedoucí k malnutrici (19, 20, 45, 46, 58)*

- a) **nedostatečný perorální příjem** (anorexie, mukositida trávicího traktu)
- b) **poruchy resorbce živin v gastrointestinálním traktu (GIT)** (mukositida GIT po přípravném chemo(radio)terapeutickém předtransplantačním režimu)
- c) **zvýšená ztráta živin do GIT** (projevy mukositidy – zvracení, průjemy)

**d)metabolické abnormality onkologicky nemocných** (zvýšení glukoneogeneze aktivitou Coriho cyklu, insulinová rezistence, zvýšený katabolismus bílkovin, zvýšená mobilizace mastných kyselin)

**e)peritransplantační komplikace** (infekce, metabolické komplikace, venookluzivní nemoc, GVHD)

### **2.2.2 Funkční důsledky malnutrice**

Výše popsané stavy se často kombinují a mohou vést k závažné malnutrici, která se stává limitujícím faktorem pro přežití nemocného.

Ztráta aktivní tělesné hmoty se projevuje poklesem funkční výkonnosti všech orgánových systémů, nenápadnější bývá snížená výkonnost svalstva (kosterního i myokardu) a imunitního systému (ve složce humorální i buněčné).

Zejména kombinace snížené kapacity dýchacího svalstva a imunoprese může být pacientům osudná, neboť je ohrožuje smrtící bronchopulmonální infekcí.

Proto je nutné malnutrici a metabolickým komplikacím předcházet a pokud se objeví, důsledně je řešit.

## **2.3 Metabolická péče u transplantace krvevorných buněk**

V peritransplantačním období je důležité pečovat o hydrataci nemocného. Dostatečnou hydrataci hradíme nejen ztráty, ale snažíme se zajistit cirkulující volem při zvýšeném úniku intravaskulární tekutiny do intersticia. Vzhledem k velkému úniku tekutiny do intersticia dochází často při hraničním naplnění cévního řečiště k výraznému intersticiálnímu edému. Ten se daří mobilizovat až při zlepšení celkového stavu pacienta (18).

Průměřená hydratace je nutná k prevenci poškození ledvin při tumor lysis syndromu, pokud transplantujeme nemocné při aktivitě onemocnění. Nutná je korekce vzniklých minerálových poruch (viz výše) a acidobazické rovnováhy (18).

## **2.4 Nutriční podpora u transplantace krvevorných buněk**

### **2.4.1 Zajištění dostatečného perorálního příjmu**

V rámci podpůrné metabolické péče u transplantace krvevorných buněk se snažíme v peritransplantačním období co nejdéle udržet dostatečný perorální příjem potravy. Zvyšujeme apetit a upravujeme konzistenci stravy. Je povolána dietní sestra, která



poskytuje možnost výběrové stravy a sleduje příjem živin. Při polykacích obtížích je nutné zajistit vhodně zvolenou tekutou stravu.

Při nedostatečném perorálním příjmu je indikována nutriční podpora formou enterální (EV) nebo častěji parenterální výživy (PV) (2, 4, 16, 17, 58, 59).

#### **2.4.2 Enterální výživa**

Enterální výživu je možné realizovat jen za podmínek anatomické a funkční integrity GIT. Tento druh výživy je proto u transplantovaných nemocných kvůli anorexii, zvracení a pocitu plnosti žaludku během léčby v důsledku mukositivity GIT velmi často limitován (2). Někdy se při přechodu z dietních úprav uplatní sipping (upíjení) některého přípravku určeného pro enterální výživu. Jejich předností proti tekuté dietě je, že zaručeně neobsahují laktózu ani gluten a jsou optimálně upraveny pro rychlé vstřebávání živin. Přesto jejich snášenlivost vzhledem k celkovému stavu pacienta při rozvoji gastrointestinálních komplikací rychle klesá. EV podávaná sondou se v peritransplantačním období prakticky neuplatňuje vůbec (44).

#### **2.4.3 Parenterální výživa**

PV připravujeme ve spolupráci s nutričním týmem. Indikujeme ji při poklesu perorálního příjmu pod 50% celkové potřeby nemocného. Nutriční podpora při transplantaci je spojena s několika zvláštnostmi (18). Ve fázi chemoterapie a neutropenie je zvýšená energetická potřeba, na níž se podílí toxické poškození orgánů, katabolismus a možná infekce. Energetická potřeba nemocného se pohybuje kolem 30-35 kcal/kg nebo ji lze odhadnout dle výpočtu bazálního energetického výdeje (Basal Metabolic Rate, BMR) dle formule Harrisa a Benedicta a vynásobeného koeficientem 1,3. Ojedinelé je možno využít k měření energetické potřeby indirektní kalorimetrií. V peritransplantačním období dochází zpravidla k negativní dusíkové bilanci i přes vyšší příjem bílkovin nebo aminokyselin. To souvisí se zvýšeným proteokatabolismem. Přívod aminokyselin by proto neměl být v této fázi vyšší než 2 g/kg.den. Vzhledem k inzulinozistenci a akcelerované glukoneogenezi bývá také snižená tolerance cukrů, proto vyšší přívod glukózy často vede k hyperglykemii. Rychlost přívodu glukózy by proto neměla přesáhnout 5-6 g/kg.den, při hyperglykemii je doporučeno podávat insulin. Stejně tak využití lipidových emulzí je limitováno poklesem aktivity lipoproteinové lipázy, proto se podává nejvýše 0,5-1 g/kg.den. Tolerance jednotlivých substrátů musí být monitorována a jejich přívod musí být regulován podle aktuálních laboratorních hodnot (glykemie,

glykosurie, triacylglyceroly, urea v séru a v moči, event. dusíková bilance). Součástí monitorování nemocného s PV je i sledování minerálů v séru a v moči, dalších dusíkatých katabolitů a jaterních testů. PV standardního složení obsahuje v denní dávce 1,3 – 1,8 g/kg.den aminokyselin, lipidy tvoří max. 30% a cukry (glukóza) asi 50-60% celkové energie. Ionty a voda se dodávají dle potřeby, vitamíny se stopovými prvky dle doporučených denních dávek (16, 17).

Specifický přístup z pohledu nutriční vyžadují některé stavy komplikující transplantaci PKB (poškození jater, ledvin, plic) (59).

V dostupných literárních pramenech není dosud jednoznačně určeno, jak koncipovat podpůrnou metabolickou péči u onkologicky a hematologicky nemocných podstupujících transplantaci krevetvorných buněk. V 80. letech byl prokázán benefit profylakticky podávané PV u nemocných podstupujících transplantaci kostní dřeně (52). Weisdorfová et al. publikovala r. 87 výsledky velké randomizované studie (soubor 137 nemocných). Poukázala především na významné rozdíly v přežívání a v období do relapsu ve skupině s profylakticky podávanou PV (signifikantně delší doba přežití a delší doba do relapsu u profylaxe). Soubor nemocných byl však značně heterogenní - zahrnoval dospělé i děti, autologně i alogenně nemocné, hematologicky, onkologicky i neonkologicky nemocné. Proto nelze vytvořit jasné závěry pro jednotlivé podskupiny nemocných. Přesto tato práce zdůrazňuje uplatnění profylaktické PV zejména u alogenních transplantací (52).

Vzhledem k tomu, že práci s tematikou profylaktické nutriční podpory u transplantovaných nemocných s hematologickou malignitou je malé množství a v problematice nejsou jasné koncipované závěry, stalo se toto téma předmětem naší studie (viz níže).

## **2.5 Ostatní podpůrná péče**

Metabolickou a nutriční péči ještě doplňují některé metody, kterými se dříve často limitující metabolické komplikace daří ovlivnit preventivně či léčebně.

Zvracení po přípravných režimech tlumíme antiemetiky. Toxicita přípravných režimů na zažívací trakt se snižuje podáváním preparátů potlačujících sekreci HCl. Od pocitů plnosti někdy mohou ulevit prokinetika. Poruchy motility tlustého střeva (průjmy) se občas

podílejí na sníženém perorálním příjmu, proto se po vyloučení infekční příčiny přistupuje k jejich symptomatické terapii antiidiarhoiky. U bolestivé mukositivity mají místo středně silná až silná analgetika. Ke zkrácení doby agranulocytózy se indikuje růstový faktor granulocytů (granulocyte – colony stimulating factor, G–CSF). Kratším obdobím agranulocytózy se snižuje riziko rozvoje infekce v neutropenii a zkracuje se i trvání slizniční mukositivity.

Prokázaná infekce se léčí antibiotiky, antimykotiky a antivirotiky cíleně, neboť vedlejším účinkem antibiotik mohou být dyspepsie horního i dolního typu (zvracení, průjem). Výjimkou je febrilní neutropenie, kdy se podává antibiotická terapie empiricky a k cílené antibiotické volbě se přistupuje až po zjištění eventuálního infekčního agens.

## **2.6 Glutamin**

### **2.6.1 *Endogenní glutamin***

#### **2.6.1.1 *Charakteristika glutaminu***

Glutamin (2 – amino - karbamidobutyrát –  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$ ) je polární aminokyselinou. Existuje ve dvou enantiomerních konfiguracích – D a L. Jedná se o amid kyseliny glutamové a patří k podmíněně esenciálním aminokyselinám (25, 58, 59).

#### **2.6.1.2 *Metabolismus glutaminu***

V konečné fázi metabolismu glutaminu se uplatňují dva enzymy – glutamin syntetáza a glutamináza (13, 47, 51, 53, 59). Produkce se soustřeďuje zejména do kosterního svalstva, plic, tukové tkáně a jater. Glutamin se v zátěžovém stavu uvolňuje do oběhu z tkání, kde jsou jeho velké zásoby. Jedná se převážně o svalovou a plicní tkáň. Degradace glutaminu se děje převážně v lymfocytech, tenkém střevě a v ledvinách, kde je vysoký obsah glutaminázy. Glutamináza odštěpuje z glutaminu amonný iont a podílí se tak na tvorbě glutamátu. Produktem transaminace glutamátu je alfa – oxoglutarát, který je přímo napojen na Krebsův (citrátový) cyklus, čímž glutamin může zasahovat do metabolismu sacharidů (resyntéza sacharidů z oxalacetátu) i tuků (resyntéza tuků z acetyl koenzymu A). Pokud je cesta rozkladu glutaminu ukončena plnou oxidací alfa – oxoglutarátu v citrátovém cyklu, využívá se vzniklé energie (13, 34, 56, 59).

### **2.6.1.3 Meziorganový přesun glutaminu za fyziologických podmínek**

Za normální situace je gln využit zejména tkáněmi s rychlým procesem buněčného dělení. Mezi tkáně, které přijímají gln tak patří střevní sliznice, kostní dřev a lymfatická tkáň. Ledviny využívají gln ke kompenzaci acidozy, játra k tvorbě ury. Gln je mobilizován ze svalstva a plic do krevního oběhu, odkud je transportován převážně do buněk trávicího traktu a ledvin.

### **2.6.1.4 Meziorganový přesun glutaminu v zátěži**

V kritických stavech (nejčastěji v sepsi, šoku) vede uvolnění toxických látek a endotoxinů do krevního oběhu k aktivaci lymfocytů a makrofágů. Dochází k uvolňování cytokinů (interleukiny, TNF), které spouštějí systémovou odpověď. Prostřednictvím hypofýzy a nadledvin stimuluje uvolnění glutaminových zásob ze svalstva a plic (42), zvyšuje se jeho syntéza (55). Zvýšená dodávka uvolněného glutaminu do střeva je nutná k reparaci střevní sliznice, a tím i střevní bariéry, s cílem zamezit translokaci bakterií do krevního oběhu. Současně se zlepši proliferace buněk kostní dřevě a lymfatické tkáně jako obranná reakce proti infekci. V játrech se zvyšuje syntéza proteinů akutní fáze. Zvyšuje se svalový katabolismus, gln se využívá k tvorbě glukózy v ledvinách a k syntéze glutathionu (GSH) se zlepšením antioxidační aktivity organismu.

### **2.6.1.5 Fyziologická úloha glutaminu**

Gln je významným stavebním substrátem a energetickým zdrojem pro rychle se dělicí buňky, které zvýšeně syntetizují nukleové kyseliny. Slouží jako donor  $\text{NH}_2$  skupiny při syntéze purinů, pyrimidinů a glukosaminu. Uhlíkatý skelet glutaminu podléhá metabolickým přeměnám a podílí se na syntéze jiných aminokyselin, převážně argininu a ornithinu, dále prolinu a hydroxyprolinu (37). S tím souvisí role v udržování integrity střevní bariéry (26, 37, 38, 50) a vliv na imunologické funkce (7, 25, 27, 50, 57). Také slouží jako transportní forma amoniaku, uplatňuje se přes glutathion při kontrole redox potenciálu buněk (13, 15, 35, 36) a je důležitý pro nervovou činnost (11).

### **2.6.1.6 Suplementace glutaminem**

V kritických stavech provázených katabolismem (seps, operace, trauma, šok, syndrom multiorganové dysfunkce, komplikovaná transplantace PKB) se vytváří deficit aminokyseliny glutaminu. Spotřeba glutaminu u dělicích buněk je často vyšší než jeho syntéza. Gln se stává za těchto podmínek podmíněně esenciální aminokyselinou. Gln přítomný v tkáních mimo zaživací trakt musí být buď syntetizován de novo nebo získán

degradaci bílkovin, a to především z kosterního svalstva. Může však být též dodáván exogenně, jako lék.

Základním důvodem suplementace glutaminu v kritických stavech je jednak podpora funkce glutamin - dependentních orgánů, jednak ušetření tělesných proteinů, ze kterých by musel být glutamin mobilizován, kdyby nebyl dodán.

## **2.6.2 Exogenní glutamin**

### **2.6.2.1 Vlastnosti**

Fyzikálně – chemické vlastnosti a nízká stabilita znemožňují použití roztoku glutaminu. Pro enterální a parenterální výživu se využívá roztoků dipeptidů glutaminu, které jsou stabilnější (13).

### **2.6.2.2 Dostupné přípravky glutaminu**

Glutamin je pro parenterální podání u nás v České republice dostupný v podobě alanyl – glutaminu (Dipeptiven®). Dostupné jsou i přípravky s obsahem glutaminu pro enterální výživu (Impact®, Supportan®, Nutricomp®). Glycyl – glutamin v ČR registrován není, stejně tak není v ČR registrován žádný perorální přípravek (13).

### **2.6.2.3 Doporučované dávky glutaminu**

Doporučované dávky glutaminu jsou 0,19 – 0,29 g/kg.den pro podporu střevní sliznice a v anaboličských indikacích, 0,37 – 0,57 g/kg.den u výrazně imunosuprimovaných nemocných (např. transplantace PKB) (13).

## **2.6.3 Úloha glutaminu v kritických stavech včetně transplantace krvetvorných buněk**

### **2.6.3.1 Podpora střevní sliznice**

Katabolismus, sepse nebo v horším případě septický šok se syndromem multiorgánové dysfunkce doprovázejí často intenzivně léčené kriticky nemocné včetně nemocných po transplantaci PKB či kostní dřeně. Je zřejmé, že střevo, stejně tak jako jiné životně důležité orgány, hraje významnou roli při syndromu multiorgánové dysfunkce a bývá vstupní branou infekce do organismu u těchto nemocných, kdy je umožněna translokace endotoxinů či bakterií do krevního oběhu. Udržení střevní bariéry se tak stává životně důležitým ochranným mechanismem organismu v těchto stavech.

Glutamin je svými vlastnostmi (viz výše) jedinečnou aminokyselinou využitelnou pro regeneraci střevní sliznice (25).

### **2.6.3.2 Ovlivnění hyperkatabolismu**

S ohledem na transplantaci PKB či KD bývá nejčastější příčinou hyperkatabolismu infekční komplikace nebo i GVHD. Glutamin má výrazný anabolický efekt, který je pro tuto aminokyselinu specifický a je akcentován při katabolických stavech.

### **2.6.3.3 Vliv na imunitní funkce**

U transplantovaných nemocných je imunitní systém poškozen převážně polékovým útlumem KD. Průvodní cytopenie s neutropenií trvá přibližně 2 týdny u autologní transplantace, déletrvající je u transplantace alogenní. Funkční imunitní systém je nezbytný pro zvládnutí většinou těžce probíhající infekční komplikace. Glutamin se svými vlastnostmi (viz výše) tak může podílet na rychlejší regeneraci buněk KD a na proliferaci buněk imunitního systému (14, 27).

### **2.6.4 Preklinické a klinické studie suplementace glutaminem u transplantace krvetvorných buněk**

Některé studie na zvířecích modelech prokázaly, že o gln obohacená PV prospívá funkci enterocyty (6), imunitního systému (6, 22) a kosterního svalu (24). Ve studii Klimberga 1990 podávání glutaminu dokázalo obnovit hladinu svalového glutaminu u zvířat s experimentálními nádory a snížit tak nádorovou kachexii (21). Ve studii Caa 1998 aplikace glutaminu umožnila rovněž udržet fyziologické hladiny glutaminu a GSH v srdečním svalu, což by mohlo mít význam při prevenci antracyklinové kardiotoxicity (9).

Přínos glutaminu u transplantace krvetvorných buněk některé klinické studie z posledních 17 let prokazují (viz níže), jiné benefit glutaminu v této indikaci popírají. Práce však jsou často mezioborové nebo se týkají všeobecné problematiky onkologicky nemocných, kde jeden soubor tvoří jak onkologičtí tak hematookologičtí nemocní. Navíc v jednotlivých studiích není často hodnocena zvlášť skupina alogenně transplantovaných oproti autologně transplantovaným nemocných. Nebývá používána stejná cesta aplikace glutaminu - buď se podává parenterálně, perorálně nebo kombinovaně.

Publikací se samostatnou problematikou hematologických malignit a transplantace krvetvorných buněk je minimum a soubory nemocných nejsou početně příliš velké. Prezentované výsledky prací týkající se přínosu glutaminu u autologní TPKB v hematologii se tak stávají nesrovnatelnými a obtížně interpretovatelnými.

V literatuře jsme našli celkem 16 studií, které se zabývají problematikou glutaminu u transplantovaných nemocných. Z toho v 11 studiích byl glutamin podáván parenterálně (5, 23, 28, 29, 32, 33, 39, 41, 48, 60, 61), ve 4 studiích perorálně (1, 8, 11, 12) a v 1 studii kombinovaně (40).

Klinické studie aplikace glutaminu u hematoonkologicky a onkologicky nemocných podstupujících transplantaci krvetvorných buněk ukazují tabulky 1, 2 a 3.

*Tabulka 1. Kontrolované studie aplikace parenterálního glutaminu vs. placebo u hematatoonkologicky a onkologicky nemocných podstupujících transplantaci PKB nebo KD*

Autor práce, rok	Druh transplantace	Dávka glutaminu/ den	Pacienti (n)	Efekt gln	Efekt glutaminu při hospitalizaci	Efekt glutaminu po propuštění
Scheltinga TR, 1991 <sup>39</sup>	Alogenní	0,57 g/kg	20	ano	Ménši expanze extracelulární tekutiny	Nesledováno
Ziegler TR, 1992 <sup>61</sup>	Alogenní	0,57 g/kg	45	ano	Kratší doba hospitalizace, méně infekcí, ménši negat. dusíková bilance	Nesledováno
Ziegler TR, 1998 <sup>60</sup> (část pacientů z Zieglerovy studie, z r. 92)	Alogenní	0,57 g/kg	20	ano	Rychlejší reparační T lymfocytů	Nesledováno
Mac Burney M, 1994 <sup>23</sup> (alkalace z Zieglerovy studie r. 92)	Alogenní	0,57 g/kg	43	ano	Nižší finanční náklady (kratší hospitalizace)	Nesledováno
Schloerb RR, 1993 <sup>41</sup>	Alogenní + autologní	0,57 g/kg	29	ano	U alogenních méně bakteriemií, kratší doba hospitalizace, ménši retenční tekutin	Nesledováno
Poynton C, 1995 <sup>29</sup>	Není znám	33 g	50	ano	Lehčí mukositida GIT, méně febrilních dnů	Nesledováno
Brown SA, 1998 <sup>5</sup>	Alogenní + autologní	33 g	34	ano	Vyšší protein C, hl. albuminu ochrana jaterních funkcí, nižší riziko VOD	Nesledováno
Picirillo N, 2003 <sup>28</sup>	Autologní	20 g, 13,5 g	27 21	ano ano	Pokles mukositidy GIT v 1. studii, v 1. a ve 2. studii rychlejší reparační lymfocytů po transplantaci	Nesledováno
Van Zaanen HCT, 1994 <sup>48</sup>	Někteří autologní, počet neuveden	26 g	15	ne		
Pytlik R, 2002 <sup>32</sup>	Autologní	20 g	40	ne		Sledováno, ale neprokázán benefit



**Tabulka 2** *Kontrolované studie aplikace perorálního glutaminu vs. placebo u hematatoonkologicky a onkologicky nemocných podstupujících transplantaci PKB nebo KD*

Autor práce, rok	Druh transplantace	Dávka glutaminu	Pacienti (n)	Efekt glutaminu	Efekt glutaminu při hospitalizaci	Efekt glutaminu po propuštění
Anderson PM, 1998 <sup>1</sup>	Alogenní + autologní	4 g/m <sup>2</sup> , 8 g/den	193	ano	Méně opiátů u autologních	Sledováno, lepší přežití u alogenních
Cockerham MB, 2000 <sup>11</sup>	Autologní	12 g/m <sup>2</sup> , 24 g/den	21	ano	Méně i.v. opiátů, nižší stupeň a trvání mukositivity	Nesledováno
Coghlin Dickson TM, 2000 <sup>12</sup>	Alogenní + autologní	15 g/m <sup>2</sup> , 30 g/den	58	ne		Sledováno, ale benefit neprokázán
Canovas G, 2000 <sup>8</sup>	Autologní	10 g/m <sup>2</sup> , 20 g/den	neuvedeno	ne		Nesledováno

**Tabulka 3** *Kontrolované studie kombinované aplikace glutaminu (perorální + parenterální) vs. placebo u hematatoonkologicky a onkologicky nemocných podstupujících transplantaci PKB nebo KD*

Autor práce	Rok publ.	Druh transplantace PKB či KD	Dávka gln	Počet pac.	Druh studie	Efekt gln při hospitalizaci	Efekt gln po propuštění (OS, DFS)
Schloerb PR <sup>40</sup>	.1999	Alogenní + autologní	0.57 g/kg.den, 44 g.den i.v., 10 g.3x denně p.o.	66	Randomizace vs. placebo	ne	Sledováno, od 150. dne lepší OS (p=0.057)

#### 2.6.4.1.1 Parenterální podání glutaminu u TPKB a KD

Pozitivní přínos parenterálního glutaminu na potransplantační průběh byl prokázán v několika studiích (5, 23, 28, 29, 39, 41, 60, 61).

Scheltinga (1991) sledoval přínos glutaminu v dávce 0,57 g/kg/den u 20 nemocných. V glutaminové skupině došlo k menší expanzi extracelulární tekutiny, jednalo se však jen o alogenně transplantované (39).

Benefit glutaminu publikoval u alogenně transplantovaných Ziegler (1992) u 45 nemocných transplantovaných s hematologickými malignitami. Prokázal efekt glutaminu v dávce 0,57 g/kg.den – nemocní byli hospitalizováni kratší dobu ( $p=0,017$ ), měli méně infekcí ( $p=0,041$ ) a menší negativní dusíkovou bilanci ( $p=0,002$ ) (61).

Ziegler (1998) retrospektivně analyzoval část nemocných z předchozí studie. Nemocní s glutaminovou suplementací měli vyšší počet CD4+, CD8+ subsetu lymfocytů. Nebyl však shledán vliv glutaminu na celkový počet leukocytů a jejich rychlejší engraftment po TPKB (60).

Mac Burneyová (1994) ekonomicky analyzovala stejnou Zieglerovu studii a poukázala na nižší finanční náklady na hospitalizaci ve skupině nemocných s glutaminem téměř o 21 000 dolarů na jednoho nemocného díky kratší době hospitalizace (23).

Schloerb (1993) autologně a alogenně transplantoval 29 hematologicky a onkologicky nemocných a část z nich aplikoval parenterálně glutamin také v relativně vysoké dávce 0,57 g/kg.den. U alogenně transplantovaných byla zjištěna kratší doba hospitalizace ( $p<0,05$ ), méně bakteriemií ( $p<0,05$ ) a snížení retence vody ( $p<0,05$ ) v glutaminové skupině. Nebyl prokázán vliv na délku mukositivity GIT, počet febrilních dnů a spotřebu ATB, engraftment leukocytů a počet infekcí (41).

Poynton (1995) publikoval výsledek dvojité slepé randomizované studie u 50 transplantovaných nemocných, kteří dostávali 0,64 g/kg (50g) glycyl - glutaminu denně. U nemocných s glutaminem se statisticky významně snížily obtíže související s mukosítidou GIT, kdy došlo k poklesu abdominální bolesti a četnosti průjmů ( $p=0,015$ ), dále v této skupině bylo zaznamenáno méně febrilních dnů ( $p=0,01$ ). V práci však není uveden druh transplantace a výsledky jsou publikovány jen jako abstrakt (29).

Brown (1998) zkoumal vliv glutaminu na protekci jaterních funkcí. Ve své práci podával 0,64 g/kg glutaminu denně u 34 hematologicky nemocných autologně a alogenně transplantovaných. Výsledky studie podporují roli glutaminu v ochraně jaterních funkcí - snížení rizika venookluzivní nemoci (5).

Piccirillo (2003) zjistil u 27 autologně transplantovaných hematologicky nemocných (zařazen byl i jeden nemocný se solidním tumorem) benefit glutaminové suplementace v dávce 0,26 g/kg.den glutaminu ve dvou směrech - pokles stupně mukositivity GIT ( $p=0,047$ ) a rychlejší reparaci imunitních funkcí s rychlejší reparací imunitního systému ( $p=0,005$ ). Další výsledky jsou však negativní – nemocní neprofitovali z glutaminu během hospitalizace. Nebyla pozorována kratší doba hospitalizace, nesnížila se spotřeba antibiotik, počet febrilních dnů, ani nebyla zkrácena doba hospitalizace v glutaminové skupině (28).

Naopak nevýznamný přínos parenterálně podávaného glutaminu prezentovali další autoři. Van Zaanen (1994) neprokázal žádný pozitivní vliv glutaminu v dávce 0,35 g/kg.den na množství infekcí, délku hospitalizace, mukositidu či úmrtnost u konvenčně léčených pacientů s akutní leukémií. Jednalo se o 15 nemocných, ne všichni byli autologně transplantováni (48).

Pytlík (2002) do své studie zařadil 40 autologně transplantovaných hematologicky, onkologicky a neurologicky nemocných. Glutamin byl podáván v dávce 0,26 g/kg.den. Parenterální aplikací glutaminu nedošlo ke zlepšení nutričního stavu nemocných. Navíc v glutaminové skupině měli nemocní méně průjmů ( $p=0,03$ ), ale horší ústní mukositidu ( $p=0,04$ ). Dále nemocní s glutaminem měli vyšší počet febrilních dnů, větší spotřebu transfuzí, větší spotřebu opiátů ( $p=0,03$ ) i antibiotik a delší dobu hospitalizace ( $p=0,06$ ) s vyššími finančními náklady na pobyt. V glutaminové skupině docházelo k častějším relapsům ( $p=0,02$ ) a úmrtím ( $p=0,05$ ) (32). Při sledování efektu glutaminu na obnovu lymfocytárních populací po vysokodávkované chemoterapii s autologní TPKB u 36 nemocných hematologicky, onkologicky a neurologicky nemocných z dvojitě slepé randomizované studie z r. 02 nebyl zjištěn signifikantní význam suplementace glutaminu (33).

#### **2.6.4.1.2 Perorálně podávaný glutamin u TPKB a KD**

Ani studie s perorálním podáním glutaminu je nedávají jednoznačnou odpověď, přestože práce Andersona z roku 1998 (1) je asi největší studií s glutaminem u transplantovaných, se zařazením 193 nemocných.

Někteří autoři ve studiích s perorálním podáním transplantovali nemocné autologně i alogenně (1, 12), jiní pouze autologně (8, 11). Denní dávka glutaminu se pohybovala od 4 g/m<sup>2</sup> tělesného povrchu/den (1) do 15 g/m<sup>2</sup>/den (12) a benefit i nevýznamný přínos byly prokázány jak u nízké, tak vyšší dávky glutaminu. Závěry jsou kontroverzní. Pokud byl

prokázán benefit u autologně transplantovaných, jednalo se pouze o snížení spotřeby opiátů (1, 11) a nižší stupeň mukositivity (11).

V práci Andersona (1998) nemocní dostávali perorálně hustou suspenzi glutaminu v dávce 4 g/m<sup>2</sup>/den. Autologně transplantovaní nemocní s glutaminovou suplementací měli nižší spotřebu opiátů. Je však zajímavé, že se skóre mukositivity nesnížilo ve skupině s glutaminem u alogenně transplantovaných nemocných. Lepší přežití bylo zaznamenáno v glutaminové skupině u alogenně transplantovaných nemocných (1).

Cockerham (2000) retrospektivně hodnotil 21 autologně transplantovaných nemocných s metastatickým karcinomem prsu. Glutamin byl podáván v podobě husté suspenze v dávce 12 g/m<sup>2</sup> povrchu těla. V glutaminové skupině byla nižší spotřeba parenterálně podávaných opiátů s kratším trváním mukositivity včetně poklesu ulcerací a krvácení v dutině ústní (11).

Význam perorálně aplikovaného glutaminu u transplantovaných některé studie popřely (8, 12).

Do prospektivní randomizované studie Coghlin – Dicksona (2000) bylo zařazeno 58 autologně a alogenně transplantovaných hematologicky nemocných, kteří dostávali buď placebo nebo 15 g glutaminu /m<sup>2</sup> povrchu těla denně. Nebyly zjištěny rozdíly v rychlosti engraftmentu leukocytů, v délce hospitalizace ani v tíži mukositivity v dutině ústní a v četnosti průjmů (12).

#### **2.6.4.1.3 Kombinované (perorální a parenterální) podání glutaminu u TPKB a KD**

Schloerb (1999), který podával glutamin u 66 autologně a alogenně transplantovaných hematologicky (n=43) i onkologicky (n=23) nemocných kombinovaně, tj. parenterálně (glutamin v dávce 0,57 g/kg.den) i perorálně (glutamin v dávce 10g 3x denně), deklaroval jen omezený význam glutaminu na dobu během hospitalizace u transplantovaných nemocných. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v délce hospitalizace, v délce podávání parenterální výživy, v rychlosti engraftmentu leukocytů po transplantaci, v incidenci pozitivivity hemokultur a počtu sepsí ani v závažnosti mukositivity. Spolehlivost závěrů této publikace je poněkud nejistá, protože srovnáním některých čísel v tabulkách a v textu nacházíme určité diskrepance, např. v charakteristice pacientů (pohlaví, počet hematologicky nemocných), ale i ve výsledcích (počty pacientů s reakcí štetu proti hostiteli, počty pacientů, u nichž bylo třeba zahájit úplnou parenterální výživu atd.). Některé výsledky jsou však nadějně, např. při dlouhodobějším sledování od 150. dne skupina s glutaminem měla lepší celkové přežití (p=0,057) (40).

### 3 Vlastní práce

#### 3.1 Úvod

V současnosti je diskutována otázka, jaké nejhodnější složení má mít PV při transplantaci PKB a kostní dřeň s ohledem na možné přednosti speciálních substrátů (např. glutamin) (62). Diskutována je i doba zahájení PV v této indikaci (52). V některých studiích z 80. let byl prokázán benefit profylakticky podávané PV (52, tabulka 4).

**Tabulka 4 Studie profylakticky podávané PV u hematoonkologicky a onkologicky nemocných podstupujících transplantaci PKB nebo KD**

Autor práce, rok	Druh transplantace	Pacienti (n)	Efekt profylaktické PV	Efekt profylaktické PV po propuštění
Weisdorf SA, 1987 <sup>52</sup>	Alogenni + autologní	137	Ano, dlouhodobý	Lepší 2 – leté celkové přežití a přežití bez známek onemocnění u skupiny s profylaktickou PV

Pozdější studie navíc prokázaly benefit suplementace glutaminem (62). Některé další studie zaměřené na přínos glutaminu během hospitalizace benefit glutaminu potvrdily, jiné vyvrátily. Pouze ojediněle byl hodnocen vliv profylaktické PV a glutaminu na dlouhodobější výsledky přežití (profylaktická PV (52), efekt glutaminu (1, 12, 32, 40).

Pro kontroverzní závěry studií probíhají diskuse, zda současně nové techniky péče o nemocné, které obecně zkrátily dobu hospitalizace oproti 80. létům (ATB, G – CSF, antiemetika), neučiní gln a podání profylaktické PV nadbytečnými.

Gln a profylaktické podání PV se v České republice používá pro svou finanční nákladnost pouze ojediněle. Význam profylaxe se nejvíce zpochybňuje u autologní transplantace PKB.

### **3.2 Cíl práce**

Zhodnocení efektu profylakticky podávané PV a suplementace glutaminem u hematologicky nemocných podstupujících autologní transplantaci PKB.

#### ***3.2.1 Úkoly***

- a) Odpovědět na otázku, zda má smysl profylakticky podávat PV u autologní transplantace PKB a zda má podání glutaminu přednost před standardním složením PV.
- b) Z výsledků odvodit kritéria pro účelnou aplikaci glutaminu, doporučit guidelines pro odpovídající skupiny nemocných.

### **3.3 Soubor nemocných a metodika**

Práci na studii jsme zahájili v srpnu r. 2000. Studie byla od r. 2002 podporována grantem IGA MZ ČR.

#### **3.3.1 Pacienti**

Do studie bylo celkem zařazeno 44 nemocných (21 mužů a 23 žen) ve věku od 18 do 69 let (medián 47 let) s hematologickými malignitami – 15 nemocných s ne – Hodgkinovým lymfomem (NHL), 14 nemocných s mnohočetným myelomem (MM), 8 nemocných s Hodgkinovým lymfomem (HL) a 7 nemocných s akutní leukémií (AL). Studie byla schválena Etickou komisí LF UK, FN a VLA JEP HK a před zařazením do studie všichni nemocní podepsali informovaný souhlas. Současně byli nemocní seznámeni s účelem studie.

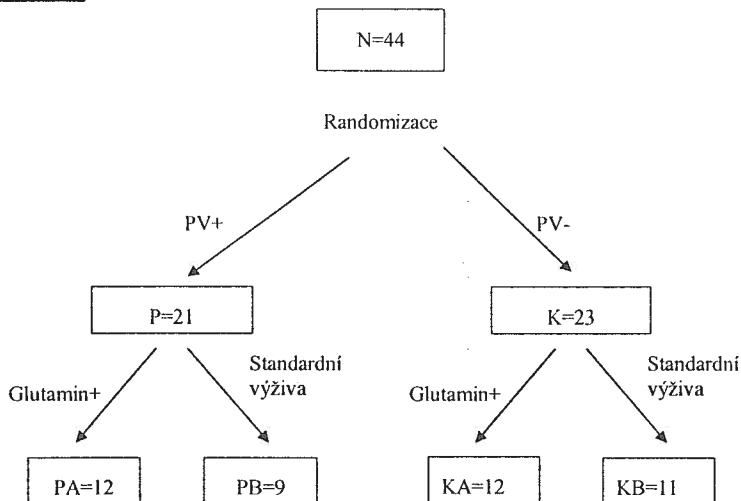
Nemocní byli léčeni na jednotce transplantační péče, kde jim před převedením autologního štěpu byl podán přípravný předtransplantační režim dle typu hematologické malignity a následně poskytnuta standardní podpůrná péče.

#### **3.3.2 Metodika**

Nemocní byli randomizováni metodou očíslovaných obálek stratifikovaně dle výše uvedených onkologických diagnóz (NHL, MM, HL, AL) do 2 skupin. Získali jsme tak profylaktickou skupinu (skupina P, n=21), kde byla PV podávána profylakticky od 1. dne přípravného cytoreduktivního režimu před transplantací, a kontrolní skupinu (skupina K, n=23), kde byl denně dietní sestrou hodnocen perorální příjem a výživa byla indikována až při poklesu perorálního příjmu pod 50% celkové energetické potřeby. Aplikace PV byla ukončena v obou skupinách tehdy, jestliže počet leukocytů dosáhl  $> 1.10^9/l$  a u nemocného se obnovil perorální příjem na alespoň 50% své odhadnuté energetické potřeby. Energetickou potřebu nemocného jsme odhadovali dle hodnoty BMR vypočtené z formule Harrisa a Benedicta  $\times 1,3$ .

Pacienti z těchto 2 skupin (kontrolní a profylaktické) byli dále randomizováni do dalších 2 podskupin. V jedné podskupině byla aplikována standardní PV (skupina B, n=20), ve druhé podskupině PV s glutaminem (skupina A, n=24) – viz obr. 1.

**Obrázek 1** Schéma randomizace

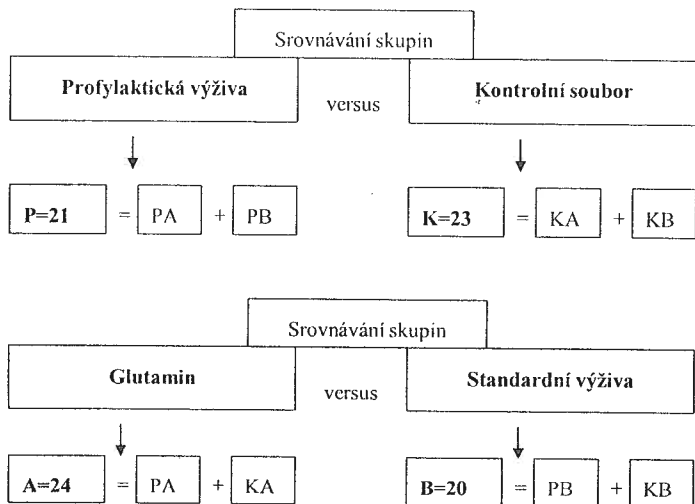


Parenterální výživa standardního složení obsahovala cukry (glukoza, cca 60% celkové energie), lipidy (max. 30% celkové energie) a standardní směs aminokyselin (1,8 g/kg.den). Voda a elektrolyty byly přidávány dle potřeby, vitamíny se stopovými prvky byly podávány dle doporučených denních dávek u dlouhodoběji podávané výživy. Parenterální výživa obohacená o glutamin (skupina A) byla isokalorická, isonitrogenní s ekvivalentním množstvím vody, elektrolytů, vitamínů a stopových prvků. Výživa ve skupině A se lišila od standardního složení pouze přítomností glutaminu (L-Ala-L-Gln, dipeptidu glutaminu ve vazbě na alanin, Dipeptiven®, Fresenius Kabi), který byl podáván v dávce 0,5 g/kg.den, tj. 3,7 ml/kg.den. Ve skupině s glutaminem (skupina A) byla potřeba aminokyselin doplněna do 1,8 g/kg.den směsí aminokyselin obohacenou o esenciální aminokyseliny (Amino Mel Nephro®, Fresenius Kabi) tak, aby byl jejich obsah shodný v obou skupinách (s glutaminem a bez glutaminu). Výživa byla dodávána v den jejího podání na transplantační jednotku a poté podávána 24 – hodinovou infúzí z plastického vaku cestou centrálního žilního katetru. Příprava PV do nutričních vaků „all in one“ byla prováděna ve Středisku přípravy umělé výživy nutričního týmu Fakultní nemocnice.

Následně jsme mohli srovnávat klinické výstupy kontrolní K skupiny vs. profylaktické P skupiny (K vs. P) a skupiny randomizované pro výživu s glutaminem A vs. bez glutaminu B – viz obr. 2.

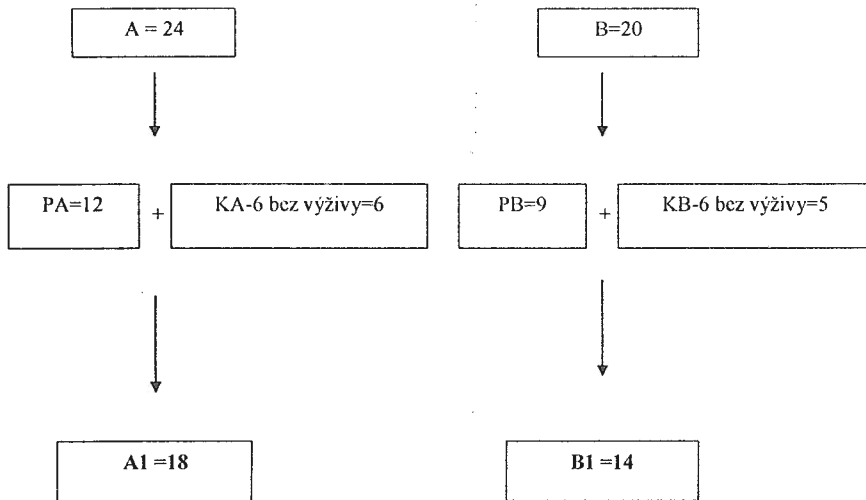


**Obrázek 2** Hodnocené skupiny



Kromě srovnávání takto primárně (randomizací) vzniklých skupin A vs. B (intention-to-treat analýza) byly post hoc srovnávány také skupiny A1 vs. B1. Ty vznikly ze skupin A a B vyřazením 12 pacientů (6+6) z kontrolní skupiny K, kteří nevyžadovali podání PV, a tudíž nakonec gln ani standardní PV nedostali. Srovnání skupin A1 a B1 tedy zahrnuje jen nemocné skutečně glutaminem nebo standardní výživou léčené – viz obr. 3. Jsou to všichni nemocní z podskupin PA (n=12) a PB (n=9) a část nemocných z podskupin KA (n=6) a KB (n=5).

**Obrázek 3** Schéma randomizace – skupiny A1 (skutečně pouze pacienti s PV a glutaminem) vs B1 (skutečně pouze pacienti s PV a bez glutaminu)



S rozdělením pacientů do skupin s výživou a glutaminem A, resp. A1 nebo s výživou bez glutaminu B, resp. B1 nebyli obeznámeni ani pacienti, ani lékaři vyhodnocující léčbu. Náhodné rozdělení do skupin bylo známo pouze určenému členu nutričního týmu ve Středisku přípravy umělé výživy.

U všech nemocných byla během hospitalizace prováděna vyšetření dle schémat – v den před chemoterapií, v den transplantace (den D), 5., 10., 20. den po transplantaci (D+5, D+10, D+20) a v den propuštění. Během hospitalizace jsme sledovali klinické, metabolické a hematologické parametry (viz níže), po propuštění jsme hodnotili dosaženou léčebnou odpověď – celkové přežití, přežití bez známek onemocnění, přežití bez nežádoucích událostí. Dosažená léčebná odpověď byla hodnocena dle stanovených kritérií (3, 10, 54).

### **3.4 Statistická analýza**

K popisu souboru bylo použito deskriptivní statistiky (mediány, kvartily, procenta, průměr).

Protože data většinou nepocházela z normálního rozdělení, byla dána přednost neparametrickým testům. Jednalo se o Wilcoxonův dvouvýběrový test (test Mann – Whitneyho) a Wilcoxonův párový test, který byl využit ke zjišťování rozdílu v jednom souboru v čase. Pro několik časových období byl použit test Friedmana. Pouze výjimečně měla data normální rozdělení, kde mohl být využit parametrický nepárový Studentův  $t$  – test.

Průběh pravděpodobností přežití byl hodnocen podle metody Kaplan – Meiera, k porovnávání byl použit logrank test. Pokud byly hodnoceny počty přežití v závěru experimentu, byl využit Fisherův přesný test. Normalita dat byla posuzována pomocí histogramů a d'Agostinova testu. Hladina významnosti byla zvolena 5%, v práci je uváděna  $p$  - hodnota. Pokud tedy byla  $p$  - hodnota  $< 5\%$ , zamítali jsme nulovou hypotézu. Ke statistickému hodnocení byl použit software NCSS.

### 3.5 Výsledky

#### 3.5.1 *Kontrolní K vs. profylaktická P skupina*

##### 3.5.1.1 *Hospitalizační fáze*

Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ukazuje tabulka 5.

**Tabulka 5 Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ve skupinách K a P**

	<b>K skupina</b>	<b>P skupina</b>	<b>p - hodnota</b>
	<b>M (1. Q – 3. Q)</b>	<b>M (1. Q – 3. Q)</b>	
<b>Počet nemocných</b>	23	21	NS
<b>Doba pobytu (d)</b>	20(16,5-21,5)	20 (17-23)	NS
<b>Pobyt od TPKB</b>	13 (13-14,5)	14 (13-15)	NS
<b>Febrilie &gt; 38 st. C</b>	1 (0-1,5)	2 (1-3)	NS, p=0,08.
<b>ATB (d)</b>	<b>8,5 (0-12,8)</b>	<b>16 (11-22)</b>	<b>p = 0,01</b>
<b>Přihojení leukocytů (d)</b>	12 (12-13)	12 (11-15)	NS
<b>Spotřena G - CSF</b>	7 (6-7,5)	7 (6-8)	NS
<b>Trombokoncestráty</b>	1 (0-2)	2 (1-2)	NS
<b>Krevní transfuze</b>	0 (0-2)	2 (0-4)	NS

Pozn.: M – medián, Q – kvartil, d – dny, ATB – antibiotika, TPKB - transplantace periferních kmenových buněk, NS – not significant

Nutnost podání PV v kontrolní skupině K: Ve skupině K bylo nutné zahájit PV u 11 nemocných (48%), tedy téměř polovina nemocných si vyžádala během transplantace podpůrnou parenterální nutrici. Medián zahájení podávání PV byl u těchto 11 nemocných 5. den od transplantace. Medián podávání PV byl v kontrolní skupině K 0 dnů, v profylaktické skupině P 17 dnů (p=0,001).

Febrilní stavy: 29 nemocných z celého souboru mělo alespoň 1 denní febrilní špičku (teplota > 38° C) během hospitalizace. Jednalo se o 13 nemocných z kontrolní skupiny K a 16 nemocných z profylaktické skupiny P. Více pozitivních hemokultur bylo zaznamenáno v profylaktické skupině P. Signifikantně vyšší spotřebu antibiotik měla profylaktická skupina P (16 vs. 8,5 antibiotických dnů v kontrolní skupině K, p=0,01).

#### Hodnocení metabolických parametrů

Váha: Během hospitalizace v profylaktické skupině P došlo k signifikantnímu vzestupu váhy ve srovnání s kontrolní skupinou K, kde byl zaznamenán celkově signifikantní pokles váhy. V obou skupinách se data v jednotlivé dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test, p<0,001 v obou případech). Hodnoty váhy se nelišily v den D+5 vs. v den dimise v kontrolní skupině K a v den D vs. D+5 v profylaktické skupině P. Mezi kontrolní

a profylaktickou skupinou byl zjištěn statisticky významný rozdíl dat ve všech dnech měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,01$ , den D  $p=0,02$ , D+5  $p=0,01$ , D+10  $p=0,05$ , den dimise  $p=0,04$ ). Největší nárůst váhy byl pozorován v obou skupinách v den D.

Celková bílkovina: Pokles celkové bílkoviny na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Největší pokles jsme pozorovali v den D+10 v obou skupinách. V kontrolní K i profylaktické P skupině se data mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,05$  v obou skupinách) (v profylaktické skupině před CHT vs. den D, vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise), v kontrolní skupině ve všech porovnávaných dnech mezi sebou s výjimkou nesignifikantního výsledku v den D vs. D+5 a v den D+10 vs. den dimise). Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,21$ , den D  $p=0,69$ , D+5  $p=0,72$ , D+10  $p=0,87$ , den dimise  $p=0,17$ ).

Albumin: Pokles albuminu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Největší pokles jsme zaznamenali v obou skupinách v den D+10. V profylaktické skupině P se data v jednotlivé dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,001$ ) s výjimkou dne D vs. D+5 a dne D+10 vs. den dimise. V kontrolní skupině K se data vzájemně signifikantně lišila s výjimkou dne D vs. den D+5. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,73$ , den D  $p=0,12$ , D+5  $p=0,14$ , D+10  $p=0,22$ , den dimise  $p=0,29$ ).

Prealbumin: V kontrolní skupině K došlo celkově k signifikantnímu poklesu prealbuminu v průběhu hospitalizace, v profylaktické skupině P se jednalo o nesignifikantní pokles. Největší pokles byl zaznamenán v obou skupinách v den D+10, větší pokles byl v profylaktické skupině. V obou skupinách se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,001$  v obou skupinách) (v profylaktické skupině P den D+5 vs. D+10, vs. den dimise, den D vs. D+10, den D vs. den dimise, před CHT vs. D+10, vs. den dimise, den D+10 vs. den dimise, v kontrolní skupině K před CHT vs. den dimise, vs. D+10, den D+5 vs. den dimise, vs. D+10, den D vs. den dimise, vs. D+10). V kontrolní skupině K se data signifikantně lišila mezi sebou s výjimkou nesignifikantního výsledku dne D vs. D+5 a dne D+10 vs. den dimise). Mezi skupinami byl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v den D+10 (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,06$ , den D  $p=0,24$ , D+5  $p=0,25$ , D+10  $p=0,04$ , den dimise  $p=0,74$ ).

Transferin: Pokles transferinu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Největší pokles byl zaznamenán v obou skupinách v den D+10. V kontrolní a profylaktické skupině se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila

(Friedmannův test,  $p < 0,001$  v obou skupinách) (pouze v profylaktické skupině P ne v den před CHT vs. den D a D+10 vs. dimise, v kontrolní skupině K ne D+5 vs. dimise, vs. D+10, den D+10 vs. den dimise. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p = 0,99$ , den D  $p = 0,95$ , D+5  $p = 0,99$ , D+10  $p = 0,58$ , den dimise  $p = 0,91$ ).

**Cholinesteráza:** Pokles cholinesterázy na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Největší pokles byl zaznamenán v obou skupinách v den D+10. V obou skupinách se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p < 0,001$  v obou skupinách) (v kontrolní skupině K ve všech porovnávaných dnech mezi sebou s výjimkou v den D+10 vs. den dimise, v profylaktické skupině P byl rozdíl v den před CHT vs. D, vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise). Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p = 0,65$ , den D  $p = 0,34$ , D+5  $p = 0,27$ , D+10  $p = 0,53$ , den dimise  $p = 0,97$ ).

**CRP:** Medián vstupní hodnoty CRP byl v kontrolní skupině K 3 mg/l (1.Q 0, 3.Q 5) a v profylaktické skupině P 2 mg/l (1.Q 0, 3.Q 5). Největší vzestup byl pozorován v den D+10 (medián 24 mg/l ve skupině K, 66 mg/l ve skupině P). Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření.

**BMI:** Medián vstupní hodnoty BMI byl v kontrolní skupině K 26,7 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 24,7, 3.Q 29,6), v profylaktické skupině P 23,6 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 22,3, 3.Q 27,5). Pouze 3 nemocní měli hodnotu BMI < 20 kg/m<sup>2</sup> (rozmezí 18,7-19,8).

### 3.5.1.2 *Hodnocení dlouhodobého efektu*

Bezprostředně po provedení autologní TPKB dosáhlo v kontrolní skupině K 16 pacientů kompletní remise, 2 pacienti nejasné KR, 4 pacienti parciální remise onemocnění a u 1 pacienta byla zaznamenána stabilizace onemocnění. V profylaktické skupině P 12 pacientů dosáhlo kompletní remise, 7 pacientů parciální remise onemocnění a u 2 pacientů se stav nezměnil (stabilizace onemocnění).

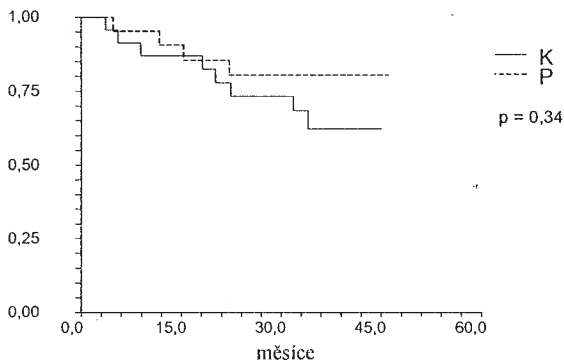
Výsledky léčebné odpovědi shrnuje tabulka 6.

**Tabulka 6** Léčebná odpověď souboru po 3 letech sledování (hodnocené skupiny: kontrolní K vs. profylaktická P)

Přežití	Skupina K	Skupina P	p-hodnota
Celkové přežití	15/23 (65%)	17/21 (81%)	p=0,32
Přežití bez známek onemocnění	10/18 (56%)	6/12 (50%)	p=1
Přežití bez nežádoucí události	10/22 (45%)	10/19 (53%)	p=0,76

**Celkové přežití:** V průběhu sledování (medián 38 měsíců) 12 (27%) nemocných zemřelo - 8 nemocných z kontrolní skupiny K a 4 z profylaktické skupiny P. K červnu 2004 přežívá 73 % nemocných. 3-leté celkové přežití je 65% v kontrolní skupině K a 81% v profylaktické skupině P (dle Fisherova přesného testu p=0,32). Průběh pravděpodobností přežití pomocí metody Kaplan-Meier ukazují graf 1 (logrank test, p=0,34).

**Graf 1** Pravděpodobnost celkového přežití ve skupinách K vs. P (dle metody Kaplan - Meiera, p - hodnota dle logrank testu)



**Přežití bez známek onemocnění:** 30 (68%) nemocných dosáhlo po 1. autologní transplantaci kompletní remise onemocnění. V souboru bylo zaznamenáno celkem 14 relapsů (47%). K relapsu došlo u 8 nemocných z kontrolní skupiny K a 6 nemocných z profylaktické skupiny P. 3-leté přežití bez známek onemocnění je 56% v kontrolní skupině K a 50% v profylaktické skupině P (Fisherův přesný test, p=1). Statistické hodnocení průběhu pravděpodobností přežití pomocí log-rank testu nebylo signifikantní (p=0,56).

Přežití bez nežádoucí události: V celém souboru selhala léčba nebo došlo k úmrtí z jakékoliv příčiny po transplantaci u 21 nemocných – u 12 nemocných z kontrolní skupiny K a 9 nemocných z profylaktické skupiny P. 3-leté přežití bez nežádoucí události je 45% v kontrolní skupině K a 53% v profylaktické skupině P (Fisherův přesný test,  $p=0,76$ ).

Statistické hodnocení průběhu pravděpodobnosti přežití pomocí log-rank testu nebylo signifikantní ( $p=0,47$ ).

### 3.5.2 Skupina s glutaminem (skupina A) vs. skupina bez glutaminu (skupina B)

#### 3.5.2.1 Hospitalizační fáze

Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ukazuje tabulka 7.

**Tabulka 7** Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ve skupinách A (s glutaminem) a B (bez glutaminu)

	A skupina	B skupina	p - hodnota
	M (1. Q – 3. Q)	M (1. Q – 3. Q)	
Počet nemocných	24	20	
Doba pobytu (d)	20,5 (17,8-22,3)	19 (16-21,5)	NS
Pobyt od TPKB (d)	14 (13-15)	13 (12,8-17)	NS
Febrilie > 38 °C	1 (0-3)	1 (1-2)	NS
ATB (d)	12 (3,5-20,5)	11,5 (6,8-14,5)	NS
Přihojení leukocytů (d)	12 (11-13)	12,5 (11-14)	NS
Spotřena G – CSF	7 (6-7,3)	7 (5-8,3)	NS
Trombokoncetráty	1 (1-2)	1,5 (0-2)	NS
Krevní transfuze	0,5 (0-4)	2 (0-2,3)	NS

Pozn.: M- medián, Q – kvartil, d – dny, ATB – antibiotika, TPKB - transplantace periferních kmenových buněk, NS – not significant

Délka podávání PV: Medián doby aplikace výživy ve skupině s glutaminem A byl 15 dnů oproti skupině bez glutaminu B s mediánem 9 dnů ( $p=0,27$ ).

Febrilní stavy: Medián počtu febrilních dnů byl ve skupině A i B 1 den.

#### Hodnocení metabolických parametrů

Váha: Během hospitalizace ve skupině s glutaminem A došlo ke 2 vzestupům váhy – v den D a v den D+10. Do propuštění se váha v obou skupinách znormalizovala. Ve skupině s glutaminem A i bez glutaminu B se data v jednotlivé dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,001$  v A,  $p=0,002$  v B). Hodnoty váhy se lišily v den D



vs. před CHT, vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise ve skupině s glutaminem A i bez glutaminu B. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v žádný den měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,25$ , den D  $p=0,33$ , D+5  $p=0,40$ , D+10  $p=0,34$ , den dimise  $p=0,31$ ).

Celková bílkovina: Pokles celkové bílkoviny na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Ve skupině s glutaminem A hodnota celkové bílkoviny postupně klesala do dne D+10, ve skupině bez glutaminu B do dne D+5. Ve skupině s glutaminem A a bez glutaminu B se data mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,05$  v obou skupinách). Hodnoty bílkoviny se lišily (ve skupině s glutaminem A před CHT vs. D, vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise, ve skupině bez glutaminu B před CHT vs. D+10, vs. den dimise). Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,34$ , den D  $p=0,46$ , D+5  $p=0,38$ , D+10  $p=0,77$ , den dimise  $p=0,73$ ).

Albumin: Pokles albuminu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Ve skupině s glutaminem A i bez glutaminu B hodnota klesala do dne D+10. V obou skupinách se data v jednotlivé dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p=0,003$  v A,  $p<0,001$  v B). Hodnoty albuminu před CHT se lišily vs. D, D+5, D+10, den dimise ve skupině s glutaminem A, ve skupině bez glutaminu B před CHT vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise, den D vs. D+10, vs. den dimise, den D+5 vs. D+10, vs. den dimise. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,29$ , den D  $p=0,84$ , D+5  $p=0,31$ , D+10  $p=0,97$ , den dimise  $p=0,17$ ).

Prealbumin: Pokles prealbuminu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl statisticky významný ve skupině bez glutaminu B. Ve skupině s glutaminem A hodnota do dne D+5 oscilovala okolo 100% vstupní hodnoty, poté došlo k markantnímu poklesu, který trval až do dimise. Největší pokles byl zjištěn v obou skupinách v den D+10. V obou skupinách se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p<0,003$  v obou skupinách). Hodnoty se lišily ve skupině s glutaminem A v den před CHT vs. D+10, vs. den dimise, den D+5 vs. D+10, vs. den dimise, den D vs. D+10, vs. den dimise, ve skupině bez glutaminu B před CHT vs. D+10, vs. den dimise, den D+5 vs. den dimise, vs. D+10, den D vs. den dimise, vs. D+10. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,88$ , den D  $p=0,46$ , D+5  $p=0,53$ , D+10  $p=0,54$ , den dimise  $p=0,70$ ).

Transferin: Ve skupinách došlo celkově během hospitalizace k signifikantnímu poklesu s nejnižší hodnotou v den D+10 a v den dimise. Ve skupině s glutaminem A a bez glutaminu B se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p < 0,05$  v obou skupinách). Hodnoty se lišily ve skupině s glutaminem A navzájem v den před CHT vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise, v den D vs. D+5, vs. D+10, vs. den dimise, ve skupině bez glutaminu B navzájem ve všech dnech měření kromě dne D+10 vs. den dimise. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p = 0,48$ , den D  $p = 0,28$ , D+5  $p = 0,45$ , D+10  $p = 0,30$ , den dimise  $p = 0,15$ ).

Cholinesteráza: Pokles cholinesterázy na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. V obou skupinách došlo k poklesu hodnoty až do dne D+10. Ve skupině s glutaminem A a bez glutaminu B se data v dané dny měření mezi sebou signifikantně lišila (Friedmannův test,  $p < 0,001$  v obou skupinách). Ve skupině s glutaminem A se hodnoty lišily ve všech porovnávaných dnech mezi sebou s výjimkou dne D vs. D+5 a dne D+10 vs. den dimise, ve skupině bez glutaminu B byl rozdíl ve všech srovnávaných dnech kromě dne D+10 vs. den dimise. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p = 0,80$ , den D  $p = 0,28$ , D+5  $p = 0,35$ , D+10  $p = 0,14$ , propuštění  $p = 0,28$ ).

CRP: Medián vstupní hodnoty CRP byl ve skupině s glutaminem A 2,5 mg/l (1.Q 1, 3.Q 6) a ve skupině bez glutaminu B 2,5 mg/l (1.Q 0, 3.Q 5). Největší vzestup byl pozorován v den D+10. Při dimisi došlo v obou skupinách k poklesu hodnot.

Analýza BMI: Medián vstupní hodnoty BMI byl ve skupině s glutaminem A 26,2 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 23,5, 3.Q 24,5), ve skupině bez glutaminu B 25,9 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 22,1, 3.Q 29,4).

### Finanční náklady

Finanční náklady na antibiotika tvořily v profylaktické skupině P téměř dvojnásobnou částku ve srovnání s kontrolní skupinou K (369 345 vs. 190 228 Kč ve skupině K). Celkové náklady na výživu v profylaktické skupině P byly téměř 2x vyšší než v kontrolní skupině K (1 333 000 vs. 709 500 Kč). Celkové finanční náklady byly na transfuze téměř o 40 000 Kč a na trombocyty z aferézy téměř o 160 000 Kč vyšší v profylaktické skupině P.

### 3.5.2.2 Hodnocení dlouhodobého efektu

Bezprostředně po autologní TPKB dosáhlo ve skupině s glutaminem A 16 pacientů kompletní remise, 1 pacient nejasně kompletní remise, 4 pacienti parciální remise onemocnění a u 3 nemocných byla zaznamenána stabilizace onemocnění. Ve skupině bez glutaminu B 12 pacientů dosáhlo kompletní remise, 1 pacient nejasně kompletní remise a 7 pacientů parciální remise onemocnění.

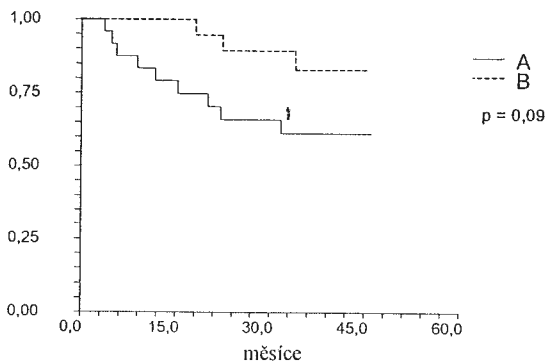
Výsledky léčebné odpovědi shrnuje tabulka č. 8.

**Tabulka 8** Léčebná odpověď souboru po 3 letech sledování (hodnocené skupiny: s glutaminem A vs. bez glutaminu B)

Přežití	Skupina A	Skupina B	
Celkové přežití	15/24 (63%)	17/20 (85%)	p=0,17
Přežití bez známek onemocnění	6/17 (35%)	10/13 (77%)	p=0,03
Přežití bez nežádoucích událostí	7/21 (33%)	13/20 (65%)	p=0,06

Celkové přežití: V průběhu sledování zemřelo 9 nemocných ze skupiny s glutaminem A a 3 nemocní ze skupiny bez glutaminu B. 3-leté celkové přežití je 63% ve skupině s glutaminem A a 85% ve skupině bez glutaminu B (Fisherův přesný test, p=0,17). Průběh pravděpodobnosti celkového přežití ukazuje graf 2 (logrank test, p=0,09).

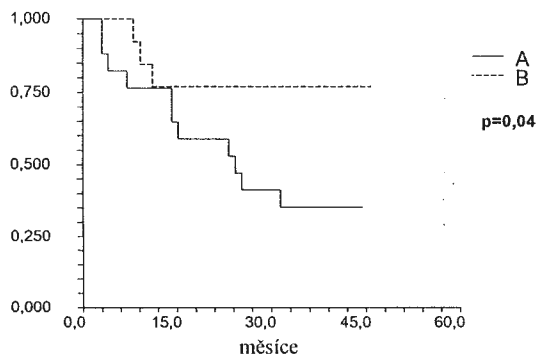
**Graf 2** Pravděpodobnost celkového přežití ve skupinách A vs. B (dle metody Kaplan – Meiera, p – hodnota dle logrank testu)



Přežití bez známek onemocnění: K relapsu došlo u 11 nemocných ze skupiny s glutaminem A a 3 nemocných ze skupiny bez glutaminu B. Pravděpodobnost 3-letého přežití bez známek

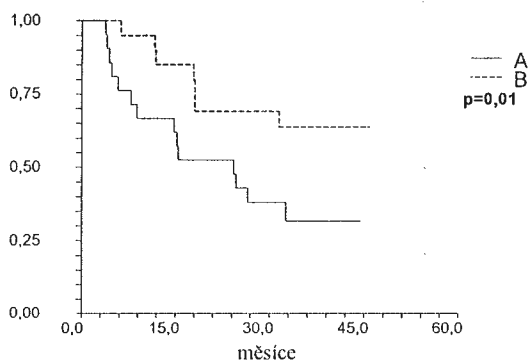
onemocnění je 35% ve skupině s glutaminem A a 77% ve skupině bez glutaminu B (Fisherův přesný test,  $p=0,03$ ). Průběh pravděpodobností přežití bez známek onemocnění ukazuje graf 3 (logrank test,  $p=0,04$ ).

**Graf 3** Pravděpodobnost přežití bez známek onemocnění ve skupinách A vs. B (dle metody Kaplan – Meiera, p – hodnota dle logrank testu)



Přežití bez nežádoucí události: Nežádoucí událost byla pozorována u 14 nemocných ve skupině s glutaminem A a 7 nemocných ze skupiny bez glutaminu B. 3-leté přežití bez nežádoucí události je 33% ve skupině s glutaminem A a 65% ve skupině bez glutaminu B (Fisherův přesný test,  $p=0,06$ ). Průběh pravděpodobností přežití bez nežádoucí události ukazuje graf 4 (logrank test,  $p=0,01$ ).

**Graf 4** Pravděpodobnost přežití bez nežádoucí události ve skupinách A vs. B (dle metody Kaplan – Meiera, p – hodnota dle logrank testu)



**3.5.3 Separátní analýza – skupina skutečně s parenterální výživou a glutaminem A1 vs. skupina skutečně s parenterální výživou a bez glutaminu B1**

Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ukazuje tabulka 9.

**Tabulka 9** Souhrn výsledků klinických a hematologických parametrů ve skupině s výživou a glutaminem A1 a s výživou bez glutaminu B1

	S výživou a glutaminem A1 M (1.Q – 3.Q)	S výživou a bez glutaminu B1 M (1.Q – 3.Q)	p – hodnota
Počet nemocných	18	14	
Doba celého pobytu (d)	21 (19-23)	19 (16,5-23,8)	NS
Pobyt od TPKB (d)	14,5 (14-15)	14 (12,3-17)	NS
Febrilie > 38 °C (d)	2,5 (1-4,5)	1,5 (0,3-2)	NS
ATB (d)	16 (10-30)	13 (10,3-15,5)	NS
Příhojení leukocytů (d)	12 (11-13)	12,5 (11-18)	NS
Spotřena G – CSF (d)	7 (6-7,8)	7 (4,5-10)	NS
Trombokoncestráty (j)	2 (1-2)	2 (0,3-2)	NS
Krevní transfuze (j)	2,5 (0-4)	2 (0,5-2)	NS

Pozn.: n – počet, M – medián, Q – kvartil, d – dny, j – jednotka, TPKB – transplantace periferních kmenových buněk, NS – not significant, p – hodnota je stanovena pomocí testu Mann-Whitney (pokud lze, pomocí t- testu)

**Délka podávání PV:** Medián doby aplikace PV ve skupině s výživou a glutaminem A1 byl 17 dnů (1.Q 14,3, 3.Q 20,8), ve skupině s výživou bez glutaminu B1 14,5 dnů (1.Q 9, 3.Q 19,3) (p=0,17).

**Febrilní stavy:** 15 nemocných ze skupiny s výživou a glutaminem A1 a 10 nemocných ze skupiny s výživou bez glutaminu B1 mělo alespoň 1 febrilní špičku (teplota > 38°C) během hospitalizace (p=0,67).

**Váha:** Během hospitalizace ve skupině s výživou a glutaminem A1 došlo ke 2 vzestupům váhy – v den D a v den D+10. Do propuštění se zde váha znormalizovala. Ve skupině s výživou a bez glutaminu B1 byl největší vzestup váhy do dne D+5. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v žádný den měření (Mann – Whitneyho test, před CHT – p=0,06, den D p=0,08, D+5 p=0,08, D+10 p=0,054, den dimise p=0,053).

**Celková bílkovina:** Pokles celkové bílkoviny na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. V obou skupinách hodnota celkové bílkoviny postupně klesala do dne D+10. Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT – p=0,76, den D p=0,88, D+5 p=0,76, D+10 p=0,41, den dimise p=0,90).

Albumin: Pokles albuminu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. Největší pokles byl zaznamenán v obou skupinách v den D+10. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,32$ , den D  $p=0,68$ , D+5  $p=0,60$ , D+10  $p=0,50$ , den dimise  $p=0,52$ ).

Prealbumin: Pokles prealbuminu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl statisticky významný v obou skupinách. Ve skupinách hodnota do dne D+5 oscilovala kolem 100% vstupní hodnoty, poté došlo k poklesu, který trval až do dimise. Největší pokles byl zjištěn ve skupině s výživou a glutaminem A1 i ve skupině s výživou bez glutaminu B1 v den D+10. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,27$ , den D  $p=0,09$ , D+5  $p=0,88$ , D+10  $p=0,93$ , den dimise  $p=0,70$ ).

Transferin: Pokles transferinu na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl statisticky významný v obou skupinách. Ve skupinách došlo celkově během hospitalizace k signifikantnímu poklesu s nejnižší hodnotou v den D+10. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,28$ , den D  $p=0,94$ , D+5  $p=0,82$ , D+10  $p=0,96$ , den dimise  $p=0,73$ ).

Cholinesteráza: Pokles cholinesterázy na konci hospitalizace oproti vstupní hodnotě byl v obou skupinách statisticky významný. V obou skupinách došlo k poklesu hodnoty až do dne D+10. Mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl dat v dané dny měření (Mann – Whitneyho test, před CHT –  $p=0,74$ , den D  $p=0,55$ , D+5  $p=0,50$ , D+10  $p=0,25$ , den dimise  $p=0,46$ ).

CRP: Medián vstupní hodnoty CRP byl ve skupině s výživou a glutaminem A1 2,5 mg/l (1.Q 1, 3.Q 4,8), ve skupině s výživou a bez glutaminu B1 3,5 mg/l (1.Q 0, 3.Q 5,8). Největší vzestup byl pozorován v den D+10 (medián 70,5 mg/l ve skupině A1, 57 mg/l ve skupině B1).

BMI: Medián vstupní hodnoty BMI byl ve skupině s výživou a glutaminem A1 26,13 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 23,19, 3.Q 27,5), ve skupině s výživou bez glutaminu B1 22,69 kg/m<sup>2</sup> (1.Q 20,95, 3.Q 28,26).

### 3.5.3.1 Hodnocení dlouhodobého efektu

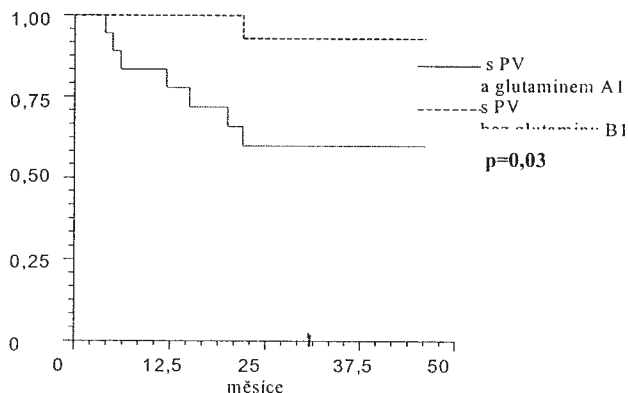
Výsledky léčebné odpovědi shrnuje tabulka 10.

**Tabulka 10** Léčebná odpověď souboru po 3 letech sledování (hodnocené skupiny: s výživou a glutaminem A1 vs. s výživou bez glutaminu B1)

Přežití	S výživou a glutaminem A1	S výživou bez glutaminu B1	p-hodnota
Celkové přežití	11/18 (61%)	13/14 (93%)	p=0,053
Přežití bez známek onemocnění	4/12 (33%)	6/9 (66%)	p=0,19
Přežití bez nežádoucí události	5/16(31%)	10/14 (71%)	p=0,06

**Celkové přežití:** V průběhu sledování zemřelo 7 nemocných ze skupiny s výživou a glutaminem A1 a 1 pacient ze skupiny s výživou bez glutaminu B1. 3-leté celkové přežití je 61% ve skupině s výživou a glutaminem A1 a 93% ve skupině s výživou bez glutaminu B1 (Fisherův přesný test,  $p=0,053$ ). Průběh pravděpodobnosti celkového přežití ukazuje graf 5 (logrank test,  $p=0,03$ ).

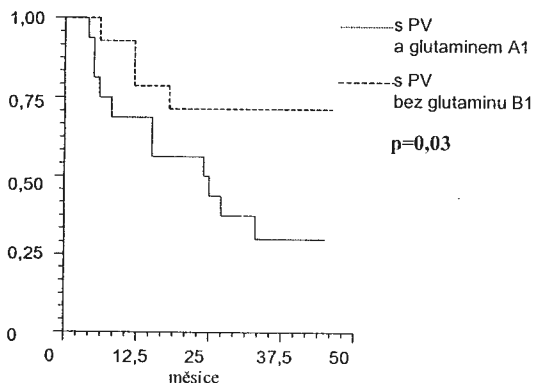
**Graf 5** Pravděpodobnost celkového přežití ve skupinách s výživou a glutaminem A1 vs. s výživou bez glutaminu B1 (dle metody Kaplan – Meiera, p – hodnota dle logrank testu)



Přežití bez známek onemocnění: K relapsu došlo u 8 pacientů ze skupiny s výživou a glutaminem A1 a 3 pacientů ze skupiny s výživou bez glutaminu B1. 3 – leté přežití bez známek onemocnění je 33% ve skupině s výživou a glutaminem A1 a 66% ve skupině s výživou bez glutaminu B1 (Fisherův přesný test,  $p=0,19$ ). Průběh pravděpodobností přežití bez známek onemocnění nebyl statisticky významný (logrank test,  $p=0,24$ ).

Přežití bez nežádoucí události: Nežádoucí událost byla pozorována u 11 nemocných ve skupině s výživou a glutaminem A1 a 4 nemocných ze skupiny s výživou bez glutaminu B1. 3-leté přežití bez nežádoucí události je 31% ve skupině s výživou a glutaminem A1 a 71% ve skupině s výživou bez glutaminu B1 ( Fisherův přesný test,  $p=0,06$ ). Průběh pravděpodobností přežití bez nežádoucí události ukazuje graf 6 (logrank test,  $p=0,03$ ).

**Graf 6** Pravděpodobnost přežití bez nežádoucí události skupiny s výživou a glutaminem A1 vs. s výživou bez glutaminu B1 (dle metody Kaplan – Meiera, p – hodnota dle logrank testu)





## 3.6 Diskuse

### 3.6.1 *Kontrolní K vs. profylaktická P skupina*

Naše výsledky nepodporují užití profylakticky podávané PV u nemocných s hematologickými malignitami během autologní TPKB (54, 55). Srovnáme – li naši studii s prací Weisdorfové, soubor našich pacientů byl početně menší (44 vs. 137 pacientů), věkově odlišnější (dospělí vs. dospělí a děti), homogennější (autologní transplantace PKB a kostní dřeně vs. autologní a alogenní transplantace PKB a kostní dřeně) se zařazením nemocných s jinými diagnózami (hematologické malignity v naší studii vs. hematologické malignity, solidní tumory, nenádorová onemocnění ve studii Weisdorfové). Při analýze podskupiny autologně transplantovaných nemocných však Weisdorfová též neshledala signifikantní rozdíl v délce přežití mezi skupinami (52).

Analýza hodnot nutričních sérových markerů a výpočet BMI ukazují, že do naší studie byli zařazeni nemocní, kteří byli v dobrém nutričním stavu, nejednalo se tedy o nemocné v malnutrici. Obecně lze říci, že k transplantační proceduře jsou na naší kliniku přijímáni nemocní v dobrém nutričním stavu, a proto z naší studie nelze posoudit, jaký efekt by mohla mít profylakticky podávaná PV u malnutričních nemocných.

Podání PV si vyžádalo 11 nemocných (48 %) z kontrolní skupiny K, což není ani polovina nemocných.

U sledovaných klinických a hematologických parametrů - délka hospitalizace, délka pobytu od transplantace, počet febrilních dnů, engraftment leukocytů, spotřeba G – CSF, hemosubstituce - nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou kontrolní K a profylaktickou P. Naopak v profylaktické skupině P byla zaznamenána signifikantně ( $p < 0,05$ ) vyšší spotřeba antibiotik (medián 16 vs. 8,5 antibiotických dnů v kontrolní skupině K).

Co se týče hodnocení délky hospitalizace, neměla by být ovlivněna délkou předtransplantačního režimu, neboť zastoupení nemocných s mnohočetným myelomem (1 denní režim) a lymfomem (6 denní režim), kde byly rozdíly délek přípravných režimů největší, je srovnatelné v obou skupinách.

V počtu febrilních dnů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami, ale více pozitivních kultur z hemokultur bylo zjištěno v profylaktické skupině P společně s vyšším záchytém pozitivních kultur z kanyly (bez statistické signifikance). Přesto lze usuzovat, že častější manipulace s infuzními sety, odběry krve z katetru s častým rozpojováním infuzní

linky a samotné dlouhodobější podávání výživy (profylaktická skupina P) při použití jednocestné nebo dvoucestné kanyly může být rizikovým faktorem pro přenos infekce u nemocných, kteří mají porušené imunitní obranné mechanismy (vyšší spotřeba antibiotik v profylaktické skupině P).

Téměř u všech sledovaných metabolických parametrů byl shledán statisticky významný rozdíl mezi jejich vstupní a výstupní hodnotou ve smyslu poklesu v obou skupinách.

Maximální nárůst hmotnosti v obou skupinách v den transplantace (den D), tedy po dokončení přípravného režimu, souvisel s parenterálním podáváním velké tekutinové nálože nemocným, která má minimalizovat vedlejší toxické projevy cytostatik. V den D došlo současně se vzestupem váhy k poklesu sérové koncentrace celkové bílkoviny i albuminu, což podporuje zvýšenou retenci tekutin v této fázi.

Ode dne D v profylaktické skupině P váha lehce klesala na konečný celkový přírůstek + 1,4% (medián relativních hodnot). Naopak v kontrolní skupině K došlo celkově během pobytu k poklesu váhy.

Interpretace výsledků retence tekutin a s tím souvisejícího vývoje hmotnosti, hodnot celkové bílkoviny, albuminu dále během hospitalizace není jednoznačná, protože u nemocných po transplantaci dochází v souvislosti s větší propustností kapilár k úniku intravaskulární tekutiny do intersticia, a tak dochází i k úniku bílkovin do tohoto prostoru.

Přesto se domníváme, že konečný přírůstek váhy v profylaktické skupině P byl způsoben retencí tekutin. Myšlenku podporuje to, že aplikace PV s celkovým obsahem cca 3 l/den po celou dobu hospitalizace představuje velkou zátěž tekutinami. Navíc v PV jsou podávány cukry, které na sebe vážou v tkáních organismu tekutiny (jaterní glykogen). To, že k maximálnímu poklesu nutričních parametrů (prealbumin, transferin, cholinesteráza) došlo v den D+10 za současného trvajícího vzestupu váhy a že k pozvolnému poklesu hmotnosti během hospitalizace došlo až při vzestupu nutričních markerů v době propuštění, nesvědčí pro významně zvýšenou proteosyntézu. Větší pokles hodnot albuminu a celkové bílkoviny během hospitalizace v profylaktické skupině P svědčí pro obtížnější mobilizaci tekutin z intersticiálního prostoru a s tím související déletrvající vzestup hmotnosti v této skupině.

Konečný pokles váhy v kontrolní skupině K lze interpretovat jako možný nástup projevů malnutrice (došlo k poklesu nutričních markerů s krátkým poločasem během hospitalizace, ale nedošlo k výraznému vzestupu CRP jako ukazatelu přednosti syntézy proteinů akutní fáze před syntézou nutričních parametrů). Jak bylo řečeno výše, pouze 48% z kontrolní skupiny K

si vyžádalo podávání parenterální nutrice a pokles váhy nejspíše souvisel s úbytkem metabolicky aktivní hmoty.

Nelze opomenout, že dynamika nutričních markerů s krátkým poločasem není v úvahách o stavu nutrice rozhodující. Pokles jejich hladin nesignalizuje pouze nutriční stav, ale může být odrazem stimulace jaterní syntézy proteinů akutní fáze na úkor proteinů viscerálních (např. při infekci). To může být i případ našeho souboru, kdy k největšímu poklesu prealbuminu, transferinu, cholinesterázy, ale i celkové bílkoviny a albuminu došlo v den D+10, což bylo v obou skupinách v době největšího vzestupu CRP (v kontrolní skupině K medián 24 mg/l, v profylaktické skupině P 66 mg/l) souvisejícího s infekčními komplikacemi v této fázi. I signifikantní pokles hodnoty prealbuminu v profylaktické skupině P oproti kontrolní skupině K v den D+10 ( $p=0,04$ ) by mohl souviset s jeho sníženou syntézou při febrilních stavech, které byly v této skupině mnohem častější. Přednost syntézy proteinů akutní fáze před viscerálními bílkovinami po transplantaci podporuje i to, že k nepatrnému vzestupu nutričních markerů došlo v době propuštění, kdy hodnota CRP v obou skupinách klesala.

V obou skupinách po zahájení léčby odpad dusíku stoupal s maximem v den D+5. V profylaktické skupině P byl větší a přetrvával déle. Odráží to jak zvýšený katabolismus bílkovin během léčby, tak (v profylaktické skupině P) zvýšený přívod aminokyselin v PV.

S ohledem na analýzu ukazatelů nutrice, dynamiky markerů zánětu a dobu projevu katabolismu lze období kolem 10. dne po transplantaci považovat za nejkritičtější fázi peritransplantačního období.

Na rozdíl od Weisdorfové (52) ani dlouhodobější sledování (3 roky) neprokázalo signifikantně lepší výsledky ve skupině nemocných s profylakticky podávanou PV. Více úmrtí, relapsů, progresí i nežádoucích událostí bylo zaznamenáno sice v kontrolní skupině K, ale výsledky nebyly statisticky signifikantní.

Závěrem lze říci, že vyšší finanční náklady v naší práci v profylaktické skupině P nebyly kompenzovány lepšími výsledky během hospitalizační fáze ani při dlouhodobějším sledování ve srovnání s kontrolní skupinou K.

### **3.6.1.1 Shrnutí diskuse**

Přístup k nutriční podpoře by se měl lišit v závislosti na typu transplantace. Přínos profylaktické PV nelze vyvrátit u alogenně transplantovaných, kde by mohla mít své místo (52). K tomu by bylo však zapotřebí vytvořit v současné době multicentrickou randomizovanou studii, neboť od roku 1987 došlo k výraznému pokroku v podpůrné péči transplantovaných

nemocných. Je možné, že rozvoj speciálních metod podpůrné léčby by mohl v současnosti maskovat eventuální přínos profylakticky podávané PV z dřívější studie z 80. let, kdy taková kvalita podpůrné péče ještě nebyla dostupná.

V případě autologně transplantovaných nemocných podobný důkaz o prospěšnosti profylakticky podávané PV v současné době nemáme. Pro nutriční podpůrnou péči u autologně transplantovaných hematologicky nemocných lze obecně shrnout, že je nezbytné monitorovat vstupní nutriční stav a dostatečnost perorálního příjmu během pobytu a až při jeho neadekvátnosti indikovat po 3-4 dnech podpůrnou parenterální nutriční.

### **3.6.2 Skupina s glutaminem A vs. skupina bez glutaminu B**

V naší studii u glutaminem suplementovaných nemocných nebyly zjištěny lepší výsledky testovaných klinických a hematologických parametrů během hospitalizace.

Nezaznamenali jsme ani pokles počtu infekčních komplikací ve skupině s glutaminem A, naopak jsme pozorovali o něco více nemocných s febriliemi v této skupině (bez statistické signifikance).

Téměř u všech sledovaných metabolických parametrů (až na hodnotu prealbuminu ve skupině s glutaminem A) byl shledán statisticky významný rozdíl mezi jejich vstupní a výstupní hodnotou ve smyslu poklesu v obou skupinách. Nejistili jsme statisticky významné rozdíly v hodnotách parametrů proteosyntézy (celková bílkovina, albumin, prealbumin, transferin, cholinesteráza) mezi skupinou s glutaminem A a bez glutaminu B. Největší pokles těchto bílkovin byl opět v den D+10.

Rozdíl váhy mezi vstupní a výstupní hodnotou nebyl zaznamenán ani v jedné skupině. Největší váhový přírůstek byl pozorován v obou skupinách v den D a v den D+10. V den D byl větší přírůstek ve skupině s glutaminem A, v den D+10 ve skupině bez glutaminu B. S přihlédnutím k tomu, že do dne D jsou nemocní nadměrně hydratováni a v den D byl zaznamenán i pokles sérových bílkovin včetně nutričních markerů v obou skupinách, jednalo se opět nejspíše o přírůstek hmotnosti v souvislosti s retencí tekutin. U dobře živých nemocných je tak rychlý vznik malnutrice (pokles nutričních parametrů) nepravděpodobný. Ke dni D+5 došlo asi k počínající mobilizaci tekutin, což již z hladin sérových bílkovin nelze jednoznačně odvodit (viz diskuse u skupiny kontrolní K a profylaktické P). Další vzestup hmotnosti v den D+10 lze dát do souvislosti s možnými infekčními komplikacemi (maximální vzestup CRP v den D+10 v obou skupinách) a opět zvýšenou hydratací nemocných – nyní jako prevence vývoje septického šoku.

Největší pokles sérových bílkovin včetně nutričních parametrů s krátkým poločasem a vzestup CRP v obou skupinách opět svědčí svědčí pro nejtěžší období okolo 10. dne po transplantaci.

Dlouhodobé sledování nezlepšilo výsledky přežívání ve skupině s glutaminem A a naopak zde bylo horší. Zaznamenali jsme více úmrtí, relapsů, progresí i nežádoucích událostí v této skupině. Při hodnocení přežití na konci sledování bylo zaznamenáno statisticky významně více relapsů ve skupině s glutaminem A (Fisherův přesný test,  $p=0,03$ ). Při statistickém hodnocení průběhu pravděpodobností přežití bylo zjištěno signifikantně kratší přežití bez známek onemocnění (logrank test,  $p=0,04$ ) a přežití bez nežádoucí události (logrank test,  $p=0,03$ ) ve skupině s glutaminem A.

Separátní analýzou skupin s výživou a glutaminem A1 a s výživou bez glutaminu B1 jsme nezískali pozitivnější výsledky pro skupinu A1. Naopak při statistickém hodnocení průběhu pravděpodobností křivek přežití bylo zjištěno signifikantně kratší celkové přežití (logrank test,  $p=0,03$ ) a přežití bez nežádoucí události (logrank test,  $p=0,03$ ) ve skupině s výživou a glutaminem A1.

Nejbliže naší práci jsou 2 studie – 1 česká (32) a 1 zahraniční (28), kde autoři podávali glutamin také parenterálně a do souboru zahrnuli pouze autologně transplantované nemocné. Bohužel jejich soubor není úplně homogenní, protože kromě hematologických nemocných Picirillo (28) zahrnul do studie i onkologicky nemocného a Pytlík (32) i neurologicky a onkologicky nemocné.

Práce Picirilla et al. prokázala přínos glutaminu ve smyslu lehčího stupně a kratšího trvání mukositivity a dále ve vlivu na dílčí imunitní funkce, kdy došlo k rychlejší reparaaci T – lymfocytů po ATPKB. Dlouhodobější sledování souboru však nebylo hodnoceno.

V práci Pytlíka et al. byl hodnocen jak efekt glutaminu na dobu hospitalizace, tak i jeho efekt na vliv přežití při dlouhodobějším sledování. Naše výsledky jsou ve shodě s prací Pytlíka. Ani díky větší homogenitě našeho souboru se zařazením pouze hematologických malignit a vyšší dávce glutaminu, která byla téměř dvakrát vyšší než v práci Pytlíka a srovnatelná s dávkou v práci Zieglera et al. 1992, jsme nedošli k přesvědčivějším výsledkům práce.

### **3.6.2.1 Shrnutí diskuse**

Z literárních údajů lze říci, že benefit glutaminu byl prokázán spíše u alogenních transplantací PKB, kdy je hospitalizace ve srovnání s autologní procedurou mnohem delší a

riziko závažnějšího narušení stavu výživy spojeným s těžkou imunosupresí, hyperkatabolismem a porušenou střevní bariérou častější.

V některých studiích hrála úlohu v přínosu parenterální suplementace glutaminem především velikost podané dávky, která při prokázaném benefitu byla často vyšší (na horní hranici maximální doporučené dávky tj. 0,57 g/kg/den) (23, 39, 60, 61) než při výsledcích nepříznivých (32, 48). Toto tvrzení však naše studie nepotvrdila.

Pokud byl benefit glutaminu prokázán u autologně transplantovaných nemocných, tak se jednalo hlavně o přínos v méně závažných klinických parametrech, jako je vliv na mukositudu, dílčí imunitní funkce, eventuálně na spotřebu opiátů během hospitalizace.

Podpůrné složky léčby v hematonekologii a onkologii (růstové faktory, nová antiemetika, antibiotika atd.) všeobecně zkrátily dobu hospitalizace, snížily počet akutních komplikací a zlepšily dlouhodobější výstup (vliv na přežití). Ačkoliv nutriční složka podpůrné péče vliv na tyto klinické parametry nemá, tak má stále při autologní transplantaci PKB své místo.

V současnosti nemá smysl vytvářet další randomizované prospektivní studie zkoumající přínos glutaminu u autologně transplantovaných, když v recentních domácích studiích přínos prokázán nebyl a v zahraničních studiích se jedná o tak minimální benefit, který jistě nemůže být důvodem k zařazení glutaminu jako standardně používané aminokyseliny do podpůrné nutriční péče.

Vhodné by však bylo zamyslet se nad randomizovanou multicentrickou studií u alogenně transplantovaných se souborem hematonekologicky nemocných s podobnou dlouhodobou prognózu onemocnění. Jen tak lze ověřit eventuelní klinickou významnost glutaminu a získat objektivnější závěry.

### 3.7 Závěr

Profylaktické podávání PV ani použití glutaminu nelze v žádném případě zařadit mezi standardní postupy při nutriční podpoře autologně transplantovaných hematonekologicky nemocných, neboť vyšší finanční náklady nebyly v profylaktické skupině ani ve skupině s glutaminem kompenzovány lepšími výsledky ve srovnání s kontrolními skupinami.

### 3.8 Seznam literatury

1. Anderson PM, Ramsay NRC, Shu XO *et al.* Effect of low-dose oral glutamine on painful stomatitis during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1998; 22: 339-344.
2. Beneš P: Základy umělé výživy. Maxdorf, 1999: 30-39.
3. Blade J, Samson D, Reece D *et al.* Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Brit J Haematol* 1998; 102: 1115-1123.
4. Brodanová M, Anděl M. Infuzní terapie, parenterální a enterální výživa. 1. vydání. Praha: Grada, 1994: 88-145.
5. Brown SA, Goringe A, Fegan C. Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1998; 22: 281-284.
6. Burke DJ, Alverdy JC, Aoye E *et al.* Glutamine – supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989; 124: 1396-9.
7. Calder PC, Newsholme EA. Glutamine promotes interleukin – 2 production by concanavalin A – stimulated lymphocytes. *Proc Nutr Soc* 1992; 51: 105A (abs.)
8. Canovas G, Leon-Sanz M, Gomez P. Oral glutamine supplements in autologous hematopoietic transplant: impact on gastrointestinal toxicity and plasma protein levels. *Haematologica* 2000; 85: 1229-1230.
9. Cao Y, Feng Z, Hoos A *et al.* Glutamine enhances gut glutathione production. *J Parent Ent Nutr* 1998; 22: 224.
10. Cheson B, Horning SJ, Coiffier B *et al.* Report of an international workshop to standardize response criteria for non – Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244-1253.
11. Cockerham MB, Weinberg BB, Lerchie SB. Oral glutamine for the prevention of oral mucositis associated with high-dose paclitaxel and melphalan for autologous bone marrow transplantation. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 300-3.
12. Coghlin Dickson TM, Wong RM, Negrin RS *et al.* Effect of oral glutamine supplementation during bone marrow transplantation. *J Parent Ent Nutr* 2000; 24: 61-66.
13. Duška F, Anděl M. Glutamin: biochemie, patobiochemie a jeho užití v umělé výživě. Časopis pro postgraduální vzdělávání – *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 1: 27-31.
14. Heberer M, Babst R, Juretic A *et al.* Role of glutamine in the immune response in critical illness. *Nutrition* 1996; 12 (suppl.): S71-2.
15. Hediger MA, Welbourne TC. Introduction: Glutamate transport, metabolism, and physiological responses. *Am J Physiol* 1999; 277: F477-F480.
16. Horáček J, Bureš J, Pidman V. Parenterální výživa v klinické praxi, 1. část - indikace a základní schéma. *Lék Zpr LF UK Hradec Králové* 1994; 39: 35-43.
17. Horáček J, Bureš J, Pidman V. Parenterální výživa v klinické praxi, 2. část - speciální situace, komplikace, perspektivy. *Lék Zpr LF UK Hradec Králové* 1994; 39: 90-99.
18. Horáček J. Poruchy vodní, minerálové a acidobazické rovnováhy. In: Bureš J, Horáček J (Eds.). *Základy vnitřního lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, 2003: 639-654.

19. Klener P, Abrahámová J, Fait V *et al.* Klinická onkologie. Praha: Galén, 2002: 231-237, 291-298, 304-306.
20. Klener P, Vorlíček J, Adam Z *et al.* Podpůrná léčba v onkologii, Galén, 1998.
21. Klimberg VS, Souba WW, Salloum RM *et al.* Glutamine-enriched diets support muscle glutamine metabolism without stimulation of tumor growth. *J Surg Res* 1990; 48: 319-323.
22. Kudsk KA, Li J, Renegar KB. Loss of upper respiratory tract immunity with parenteral feeding. *Ann Surg* 1996; 223: 629-38.
23. McBurney M, Young LS, Ziegler TR *et al.* A cost-evaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplantation. *J Am Diet Assoc* 1994; 94: 1263-66.
24. Naka S, Saito H, Hashiguchi Y *et al.* Alanyl-glutamine –supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. *J Parent Ent Nutr* 1996; 20: 417-423.
25. Neu J, DeMarco V, Li Nan. Glutamine: clinical applications and mechanism of action. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 69-75.
26. Neu J, Potsic BJ, DeMarco V. Glutamine deprivation: effects on the small intestinal barrier. *FASEB J* 2001;15: A294.
27. Newsholme P. Why is L – glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *Am Soc Nutr Sci* 2001: 2515S-2522S.
28. Piccirillo N, Matteis S, Laurenti L *et al.* Glutamine – enriched parenteral nutrition after autologous peripheral blood stem cell transplantation: effects on immune reconstitution and mucositis. *Haematologica* 2003; 88: 192-200.
29. Poynton C. Glycyl L – glutamine reduces gut toxicity in bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86, 586 (abstr.).
30. Poznarova A, Horacek J, Zak P *et al.* A randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transpl* 2003; 31 (Suppl. 1):S219 (abstr. 750).
31. Poznarova A, Horacek J, Zak P *et al.* A randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for non – Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Hematol J* 2003; 4 (Suppl. 2): 82 (abstr. 0251).
32. Pytlik R, Benes P, Patorkova M *et al.* Standardized parenteral alanyl – glutamine dipeptide supplementation is not beneficial in autologous transplant patients: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Bone Marrow Transpl* 2002; 30: 953-61.
33. Pytlik R, Gregora E, Benes P, Kozak T. Effect of parenteral glutamine on restoration, of lymphocyte subpopulations after high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell transplantation: data from a double-blind randomized study. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2002; 51: 152-5.
34. Quan J, Fitch D, Fleming SE. Rate at which glutamine enters TCA cycle influences carbon atom fate in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;275: G1299-G1308.
35. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr* 2000; 130: 978S-982S.
36. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. *Am J Physiol* 1997; 273: E408-E415.



37. Reeds PJ, Burrin DG. Glutamine and the bowel. *J Nutr* 2001; 131: 2505S-2508S.
38. Rhoads M. Session III: Physiological aspects of glutamine metabolism II – discussion summary. *J Nutr* 2001; 131: 2532S-2534S.
39. Scheltinga MR, Young LS, Benfell K *et al*. Glutamine enriched intravenous feedings attenuate extracellular fluid expansion after surgical stress. *Ann Surg* 1991; 214: 385-393.
40. Schloerb PR, Skikne BS. Oral and parenteral glutamine in bone marrow transplantation: a randomized, double-blind study. *J Parent Ent Nutr* 1999; 23: 117-122.
41. Schloerb PR, Amare M. Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications (a randomized double-blind study). *J Parent Ent Nutr* 1993; 17: 407-413.
42. Souba WW, Plumley DA, Salloum RM. Lung glutamine metabolism. *J Parent Ent Nutr* 1990. 14: 68S-70S
43. Sýkorova A, Horáček J. Malnutrice a podpůrná metabolická péče u transplantace periferních kmenových buněk. *Lék Zpr* 2004; 49 (3-4): 87-98.
44. Szeluga DJ. Nutritional support of bone marrow transplant recipients: a prospective, randomized clinical trial comparing total parenteral nutrition to an enteral feeding program. *Cancer Res* 1987; 47: 3309-3316.
45. Tomiška M, Klener P. Metabolické komplikace u nádorových onemocnění. In Klener P, Vorlíček J, Adam Z *et al*. Podpůrná léčba v onkologii. 1. vydání. Praha: Galén, 1998: 109-118.
46. Tomiška M. Nutriční problémy onkologicky nemocných. In: Klener P, Vorlíček J, Adam Z *et al*. Podpůrná léčba v onkologii. 1. vydání. Praha: Galén, 1998: 31-42.
47. Van der Hulst RRWJ. Glutamine, an essential nutrient for the gut. *Lancet* 1993; 341.
48. Van Zaanen HCT, Van Der Lelie H, Timmer JG *et al*. Parenteral glutamine dipeptide supplementation does not ameliorate chemotherapy - induced toxicity. *Cancer* 1994; 74: 2879-84.
49. Vaňásek J, Starý J, Kavan P *et al*. Transplantace kostní dřeně. I. vydání. Praha: Galén, 1996: 18-44.
50. Watford M. Session III: Physiological aspects of glutamine metabolism II – discussion summary. *J Nutr* 2001; 131: 2523S-2524S.
51. Watford M. Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid. *J Nutr* 2000; 130: 983S-987S.
52. Weisdorf SA, Lysne J, Wind D *et al*. Positive effect of prophylactic total parenteral nutrition on long – term outcome of bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 833-838.
53. Welbourn TC, Nissim I. Regulation of mitochondrial glutamine/glutamate metabolism by glutamate transport: studies with <sup>15</sup>N. *Am J Physiol* 2001; 280: C1151-C1159.
54. Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD. Acute and chronic myeloid leukemia. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds.). *Harrison's principles of internal medicine (15<sup>th</sup> ed.)*. McGraw-Hill: New York 2001, pp: 706-714.
55. Wolfe RR. Session II – Physiological aspects of glutamine metabolism I – discussion summary. *J Nutr* 2001; 131: 2496S-2497S.

56. Yang D., Brunengraber H. Glutamate, a window on liver intermediary metabolism. *J Nutr* 2000; 130: 991S-994S.
57. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T – lymphocytes. *J Nutr* 1997; 13: 646-651.
58. Zadák Z, Sobotka L, Teplan V *et al.* Vybrané kapitoly z metabolismu a výživy. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1997: 31-70.
59. Zadák Z. Výživa v intenzivní péči. 1. vydání. Praha: Grada, 2002: 97-124, 195-313, 425-431.
60. Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL *et al.* Effects of glutamine supplementation in circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci* 1998; 315: 4-10.
61. Ziegler TR, Young LS, Benfell K *et al.* Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation-a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Int Med* 1992; 116: 821-28.
62. Ziegler TR. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. *J Nutr* 2001; 131: 2578S-2584S.

## 4 Seznam prací autora

### 4.1 Původní práce

1. Sýkorová A, Horáček J. Malnutrice a podpůrná metabolická péče u transplantace periferních kmenových buněk. *Lék. Zpr.* 2004; 49 (3-4): 87-98
2. Sýkorová A, Horáček J. Úloha glutaminu u kriticky nemocných. *Lék. Zpr.* 2004, 49 (7-8):269-282.
3. Sýkorová A, Horáček J. Úloha glutaminu u transplantace periferních kmenových buněk a kostní dřeně. *Lék. Zpr.* 2004, 49 (7-8): 283-294.
4. Sykorova A, Horacek J, Zak P, Kmonicek M, Bukac J., Maly J. A randomized, double blind comparative study of prophylactic parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for hematological malignancies – three years' follow up. *Neoplasma* 2005, 52: 476-482.
5. Poznarová A., Maisnar V., Rešl M., Krejssek J., Žák P., Malý J. MALT lymfom s plicní lokalizací. *Klin. Onkol.* 2002; 4: 148-152. ISSN 0862-495.
6. Poznarová A., Belada D., Žák P. Hodgkinův lymfom – klasifikace a terapie. *HK Seminář z vnitřního lékařství VII* 2003: 7-10, ISBN 80-903238-7-1.
7. Sýkorová A., Belada D., Maisnar V., Voglová J., Žák P., Smolej L., Bukač J., Malý J. Výsledky léčby Hodgkinova lymfomu v letech 1996-2004 se zaměřením na léčbu relapsů a primárně progresivních onemocnění. *Trans Hemat dnes* 2005; 11: 40-46. ISSN 1213-5763.
8. Voglová J., **Poznarová A.**, Rabasová J., Beránek M., Moravcová J., Faber E., Klamová H., Cikhart M. Imatinib mesylát (Glivec®) v léčbě chronické fáze chronické myeloidní leukemie. *Vnitř. Lék.* 2004; 50: 21-29. ISSN 0042-773X.
9. Belada D., **Sýkorová A.**, Žák P., Malý J. Současný pohled na léčbu nemocných s folikulárním B – nehodgkinovým lymfomem, nové trendy v léčbě tohoto onemocnění. *Edukační sborník - XXVIII. Brněnské onkologické dny* 2004: 237-240. ISBN 80-867993-01-X.

### 4.2 Abstrakta

1. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Zachoval R., Malý J.. Podpůrná metabolická péče při transplantaci periferních kmenových buněk. *Sborník abstrakt – XV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2001: 186 (abstr. P 21)
2. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Malý J.. Glutaminem suplementovaná parenterální výživa při autologní transplantaci periferních kmenových buněk (ATPK) u hematologických malignit – dvojité slepá kontrolovaná randomizovaná prospektivní studie. *Sborník abstrakt - XXII. dny mladých internistů* 2003: 58, ISBN -244-0645-4.
3. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Malý J.. A randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Hematology J* 2003; 4 (Suppl. 2): 82 (abstr. 251). ISSN 1466-4860.

4. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Malý J.. A randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transpl* 2003; 31 (Suppl. 1): S219 (abstr. 750). ISSN 0268-3369.
5. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Malý J.. A randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Abstract book of E.S.F.H. 14<sup>th</sup> Congress of the Interdisciplinary European Society for Haemapheresis and Haemotherapy, 9. pracovní dny společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP a Slovenskej hematologickej a transfuziologickej spoločnosti SLS* 2003: 44 (abstr 24). ISBN 80–903238–8-X.
6. Poznarová A., Horáček J., Žák P., Kmoníček M., Malý J. A randomized , double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2003; 46: 57, ISSN 1211-4286.
7. Sykorova A, Horacek J, Zak P, Kmonicek M, Bukac J, Maly J. Three years' follow up in a randomized, double blind comparative study of parenteral nutritional support with or without glutamine in autologous stem cells transplantation for hematologic malignancies. *Hematology J* 2004; 5 (Suppl.2): S50 (abstr. 146). ISSN 1466-4860.
8. Poznarová A., Maisnar V., Rešl M., Krejsek J., Žák P., Malý J.. MALT lymfom s plicní lokalizací. *Knihá abstrakt - XIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2000: 136 (abstr. 113).
9. Poznarová A., Žák P., Voglová J., Maisnar V., Chrobák L., Malý J.. Akutní promyelocytární leukemie s hepatosplemomegalií, s leukemickými buňkami obsahujícími hrubá zrna bez Auerových tyčí a cytochemickými znaky monocytů – popis případu. *XV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2001: 189.
10. Poznarová A., Maisnar V., Dulíček P., Vižďa J., Voglová J., Malý J.. Úloha vyšetření trombocytů při indikaci splenektomie u nemocných s idiopatickou trombocytopenickou purpurou. *Trombóza a hemostáza* 2001:109. ISBN 80-902753-4-6.
11. Poznarová A., Žák P. Kompletní atrioventrikulární blok u akutní promyelocytární leukemie – popis případu. *Knihá abstrakt - XVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2002.
12. Poznarová A., Voglová J., Chrobák L., Vogel J., Faber E., Cíkhart M. Vliv Glivecu na střední objem erytrocytu u nemocných s CML v chronické fázi. *Laboratorní hematologie* 2002: 83. ISBN 80-902753-8-9.
13. Poznarová A., Voglová J., Chrobák L., Vogel J., Faber E., Cíkhart M.. Změny středního objemu erytrocytu (MCV) u nemocných s CML léčených Glivecem. *Knihá abstrakt – XIII. Český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí* 2002 (abstr. P163).
14. Poznarová A., Voglová J., Beránek M., Rabasová J., Belada D., Mašín V.. Porovnání výsledků konvenční cytogenetiky (CG), FISH a QRT-RT-PCR u nemocných v chronické fázi CML léčených imatinibem (STI 571, Glivec®) *Sborník abstrakt - XVII. Olomoucké dny s mezinárodní účastí* 2003: 7-8.

15. Poznarová A., Voglová J., Beránek M., Rabasová J., Belada D., Mašín V.. Comparison of cytogenetic and molecular genetic methods in patients in chronic phase of chronic myeloid leukemia (CML) treated with imatinibe mesylate. *Hematology J* 2003; 4 (Suppl. 2): 180 (abstr. 588). ISSN 1466-4860.
16. Poznarová A., Mířková E., Belada D., Žák P.. Pozitivita MRSA (methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*) u 2 nemocných s Hodgkinovou chorobou léčených chemoterapií eskalovaný BEACOPP. *Sborník přednášek - X. Jihočeské onkologické dny* 2003: 48. ISBN 80-238-7485-3.
17. Sýkorová A., Belada D., Žák P., Malý J. Výskyt infekcí u pacientů s pokročilým stádiem Hodgkinova lymfomu léčených chemoterapií BEACOPP. *Sborník abstrakt - XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2004: (abstr. P34). ISBN 80 - 7346 - 023 - 8.
18. Sýkorová A., Belada D., Žák P., Malý J.. Infections in patients with advanced Hodgkin's disease treated with escalated BEACOPP. *Hematology J* 2004; 5 (Suppl. 2): S326-327 (abstr. 993). ISSN 1466-4860.
19. Sykorova A, Belada D, Maisnar V, Voglova J, Zak P, Smolej L, Siroky O, Malý J. Retrospective analysis of treatment of primary progressive and/or relapsed Hodgkins disease in 1996-2004. *Haematologica* 2005; 90 (Suppl 2):413 (abstr. 1064). ISSN 0390-6078.
20. Malý J, Peychl J, Rudolf E., Červinka M., Fiedle Z., **Poznarová A.** et al.: Pathogenesis, diagnosis and therapy of malignant disease. *Acta Medica* (Hradec Králové) 2001; 44: 62. ISSN 1211-4286.
21. Voglová J., **Poznarová A.**, Rabasová J. STI 571 v léčbě chronické myeloidní leukemie v chronické fázi. XV. *Sborník abstrakt - Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2001: 76 (abstr. 61).
22. Voglová J., **Poznarová A.**, Rabasová J., Faber E., Chrobák L., Beránek M. Výsledky léčby chronické fáze CML Glivecem. *Kniha abstrakt - XIII. Český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí* Praha 2002:(abstr. 72).
23. Malý J., Peychl J., Rudolf E., Červinka M., Fiedler Z., Geršl V., Adamcová M., Rešl M., Jandík P., Vobořil Z., Bureš J., Kopáčová M., Horáček J., **Poznarová A.**, Blažek M., Melichar B., Králičková P., Žák P., Kmoníček M., Jebavý L. Pathogenesis, diagnosis, and therapy of malignant diseases. *Acta Medica* (Hradec Králové) 2003; 46: 50-51. ISSN 1211-4286.
24. Voglova J., Bláha M., Maisnar V., Beránek M., **Poznarova A.**, Rabasova J.. Collection of stem cells using granulocyte – stimulating – factor in chronic myeloid leukemia patients treated with Glivec. *Hematology J* 2003; 4 (Suppl. 2): 181. (abstr. 592). ISSN 1466-4860.
25. Voglova J., **Poznarova A.**, Chrobak L., Vogel J., Faber E., Cikhart M. Mean cell volume changes in CML patients treated with Glivec. *Leuk Lymph* 2003; 1.335(44) suppl.: S75.
26. Voglova J., **Poznarova A.**, Rabasova J., Faber E., Chrobak L., Cikhart M.: Czech experience with Glivec in the treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leuk Lymph*; 1.335 (44) suppl.: S75.

27. Voglova J., Blaha M., Maisnar V., Beranek M., **Poznarova A.**, Rabasova J. Collection of stem cells using granulocyte – stimulating – factor in chronic myeloid leukemia patientstreatedwithGlivec. *Abstract book - ESFH 14<sup>th</sup> Congress of the Interdisciplinary European Society for Haemapheresis and Haemotherapy, 9. pracovní dny společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP a Slovenskej hematologickej a transfuziologickej spoločnosti SLS* 2003: 42 (abstr. P16), ISBN 80-903238-8-X.
28. Voglová J., Rabasova J., Chrobak L., Klamova H., Brezinova J., **Sykorova A.**, Faber E., Jarosova M., Brychtova Y., Vozobulova V.. Abstracts for the 9<sup>th</sup> Annual Congress of the European Hematology Association (Geneva) - *Hematology J* 2004; (Suppl. 2): S302 (abstr. 913). ISSN 1466-4860.
29. Voglová J., Rabasová J., Chrobák L., Klamová H., Březinová J., **Sýkorová A.**, Faber E., Jarošová M., Brychtová Y., Vozobulová V.. Prognostický význam cytogenetických změn zjištěných u nemocných v chronické fázi chronické myeloidní leukemie při léčbě imatinibem. *Sborník abstrakt – XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2004, 29: (abstr. 33). ISBN 80 – 7346 – 023 – 8.
30. Smolej L., Andrys C., Pour L., Maisnar V., Belada D., Široký O., Žák P., **Sýkorová A.**, Voglová J., Bláha M., Malý J. Hodnocení plasmatických koncentrací angiogenních aktivátorů bFGF a VEGF metodikou ELISA u lymfoproliferativních onemocnění. *Sborník abstrakt - XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí* 2004, ISBN 80 – 7346 – 023 – 8, (abstr. P52).
31. Voglova J., Blaha M., Beranek M., Maisnar V., **Sykorova A.**, Rabasova J., Belada D. Collection of peripheral blood stem cells in chronic myeloid leukemia patients treated with Glivec. *Abstract book - Bone Marrow Transpl* 2005: 35, (abstr. P806).

#### **4.2.1 Pouze posterly bez publikací jejich abstrakt**

1. Zak P., Voglova J., **Poznarova A.**, Maisnar V., Chrobak L., Malý J. Acute promyelocytic leukemia – case report. *The Congress of Acute Promyelocytic Leukemia – Roma, Italy, 7/01.*
2. Belada D., **Poznarová A.**, Žák P., Malý J., Lonský V., Rozsival V. Angina pectoris vyžadující chirurgický zákrok jako pozdní následek radioterapie u mladé pacientky s Hodgkinovým lymfomem. *X. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, dne 9.-12.10. 2003, poster.*
3. Žák P., Belada D., **Poznarová A.**, Maisnar V., Smolej L., Malý J.. Gemcitabine v terapii relapsu Hodgkinova lymfomu po autologní transplantaci krvetvorných buněk rezistentních k jiné terapii – vlastní zkušenosti. *X. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, dne 9.-12.10. 2003, poster.*

## 5 Summary

**Background** Intensive chemotherapy and radiotherapy preceding bone marrow transplantation in haematologic malignancies, as well as the transplantation itself, usually leads to functional and metabolic disturbances, with a risk of malnutrition. Therefore, supportive care, including metabolic and nutritional support, is indicated.

Glutamine (gln) is essential for malnourished patients in the critical state. That opens a question about the role of gln in patients (pts) undergoing stem cells transplantation (SCT), which is typically complicated by immunosuppression, damaged intestinal mucosa and hypermetabolism. The gln supplementation during SCT in the Czech Republic is rarely used, because of controversial data about its efficiency. Standards of nutritional support in SCT have recently been questioned due to advent of newer techniques of supportive care that shorten the critical post – transplant period.

**Aim** Our aim was to evaluate the possible significance of prophylactic parenteral nutrition (PN) in SCT and the suggested advantage of gln supplementation.

**Patients and methods** Since 2000 we have conducted randomized, double blind comparative study of prophylactic PN with or without gln in autologous SCT for hematologic malignancies. 44 adult pts (15 with non – Hodgkin’s lymphoma, 14 with multiple myeloma, 8 with Hodgkin’s disease and 7 with acute leukemia) were randomized to receive either prophylactic PN starting with the cytoreductive regimen (P group, n=21), or PN given ad hoc (C group, n=23). In each group, they were further randomized to receive standard PN (B group, n=20), or PN with 0.5g glutamine/kg as L-Ala-L-Gln (A group, n=24). The groups (groups C vs. P and A vs. B) were evaluated during hospital stay and during follow-up with median 38 months.

**Statistical analysis** The results were expressed as medians, quartils and proportions. Statistical significance was tested using Mann Whitney, Wilcoxon and Fisher exact tests, as appropriate. For survival analysis, Kaplan-Meier method was used and survival differences were analyzed with log-rank test.

**Results** *Hospital stay:* The higher cost in the P group was not compensated for by better outcome. There was no significant difference in the length of hospital stay, time to leucocyte engraftment, G-CSF consumption, or in the nutritional markers in the P and C groups. On the contrary, in the P group there were significantly ( $p<0.05$ ) higher ATB consumption (16 vs.

8.5 ATB days in C group) and higher decrease of prealbumin in the hospital stay. Gln – supplemented patients (in both C and P groups) did not better in any of the parameters tested.

*Follow –up:* The final outcome rates in C/P/A/B groups, respectively /overall survival (OS) 65/81/63/85%, event-free survival (EFS) 45/53/33/65% and disease-free survival (DFS) 56/50/35/77%/, were not significantly different, apart from A<B in DFS rate (p=0.03, Fisher’s exact test). Also in survival analysis (logrank test), no significant difference between groups C and P was found but generally worse parameters were observed for A vs B group: for DFS (p=0.04) and EFS (p=0.01). the difference was significant and for OS (p=0.09) it was borderline.

**Conclusions** In three years’ follow up, no clinically useful benefit of prophylactic PN in autologous transplant patients was proven. Also, glutamine supplementation was not helpful, and was even connected with apparently worse long-term outcome.

**This study was supported by grant NB/7000-3 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Public Health of the Czech Republic**





