

EKSTRAKORPORALNA FOTOFEREZA U LIJEČENJU KRONIČNE REAKCIJE TRANSPLANTATA PROTIV PRIMATELJA

EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS IN TREATMENT OF CHRONIC GRAFT VERSUS HOST DISEASE

INES BOJANIĆ, RANKA SERVENTI SEIWERTH, SANJA MAZIĆ, KLARA DUBRAVČIĆ,
DRAGO BATINIĆ, BRANKA GOLUBIĆ ČEPULIĆ, BORIS LABAR*

Deskriptori: Bolest transplantata protiv primatelja – dijagnoza, liječenje; Fotofereza – metode; Transplantacija krvotvornih matičnih stanica – neželjeni učinci; Homologna transplantacija; Imunosupresivni lijekovi – terapijska primjena; Kronična bolest

Sažetak. Ekstrakorporalna fotofereza (EF) jest imunomodulatorna terapija koja se rabi u liječenju kronične reakcije transplantata protiv primatelja (engl. chronic graft versus host disease, cGVHD). Tijekom EF-a leukaferezom se iz krvi izdvajaju mononuklearne stanice, *ex vivo* im se dodaje 8-metoksipsoralen, stanice se ozrače UVA-zrakama i potom reinfundiraju bolesniku. Cilj istraživanja bio je procijeniti klinički i imunomodulatorni učinak postupka EF-a u bolesnika s cGVHD-om. Analiziran je 341 postupak EF-a u 7 bolesnika s cGVHD-om s medijanom EF-a po bolesniku 37 (raspon 13–131). U svih bolesnika cGVHD se manifestirao kožnim promjenama u kombinaciji sa simptomima drugih organskih sustava. EF su provedene dva dana za redom: prvih mjesec dana svaki tjedan, sljedeća 2 mjeseca svaki drugi tjedan, a potom jednom na mjesec. Medijan trajanja liječenja postupkom EF-a iznosio je 10 mjeseci (raspon 2 do 58). EF je većinom povoljno utjecao na simptome cGVHD-a pa je u 6 bolesnika došlo do poboljšanja i/ili stabilizacije promjena kože te bolje pokretljivosti zglobova, a u 2 bolesnika s ulceracijama sluznice usne šupljine promjene su se u cijelosti povukle. Do kliničkog poboljšanja došlo je 2 do 3 mjeseca nakon početka EF-a, što je omogućilo značajno smanjenje ili prestanak primjene glukokortikoida. Neželjene reakcije javile su se tijekom 4,9% postupaka. U bolesnika u kojih je došlo do poboljšanja kliničkog stanja normalizirale su se vrijednosti omjera CD4+/CD8+ stanica, kao i broj NK-stanica. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da primjena EF-a povoljno utječe na simptome cGVHD-a i omogućuje sniženje doze kortikosteroida uz poboljšanje kvalitete života bolesnika pa se stoga može preporučiti za bolesnike koji ne odgovaraju na standardno liječenje.

Descriptors: Graft vs host disease – diagnosis, therapy; Photopheresis – methods; Hematopoietic stem cell transplantation – adverse effects; Transplantation, homologous; Immunosuppressive agents – therapeutic use; Chronic disease

Summary. Extracorporeal photopheresis (ECP) is an immunomodulatory therapy which has been used in the treatment of chronic GVHD (cGVHD). ECP involves separation of the mononuclear cells with leukapheresis, followed by *ex vivo* administration of 8-methoxypsoralen and UV-A radiation and reinfusion to the patient. Aim of the study was to evaluate clinical and immunomodulatory effect of ECP procedures in patients with cGVHD. We analyzed 341 ECP procedures performed in 7 patients with cGVHD; median ECP per patient was 37 (range 13–131). All patients suffered from skin changes in combination with impaired joint mobility and symptoms of oral disease. ECP procedures were performed for two consecutive days: in initial phase weekly, followed by every two weeks and then monthly according to clinical response. Median of ECP treatment duration was 10 months (range 2–58). The effect of ECP in patients with cGVHD with skin and joint involvement was mostly beneficial: 6 patients experienced either improvement or stabilization in skin changes and joint mobility. In 2 patients who suffered from oral disease, the total recovery was observed. Clinical response was typically delayed until 2 to 3 months, and reduction in glucocorticoid dose was observed. Adverse reactions were observed in 4.9% procedures. In patients who responded to ECP treatment, CD4+/CD8+ ratio and number of NK cells were normalized. ECP proved to be an efficient and safe procedure that may be recommended for patients with cGVHD who do not respond to conventional therapy.

Liječ Vjesn 2013;135:139–144

Kronična reakcija transplantata protiv primatelja (engl. chronic graft versus host disease, cGVHD) vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta koji nije vezan uz povrat bolesti te značajnog smanjenja kvalitete života bolesnika liječenih transplantacijom alogernih krvotvornih matičnih stanica (KMS).¹ Iako patofiziologija cGVHD-a nije potpuno razjašnjena, smatra se posljedicom aktivnosti davateljnih aloreaktivnih limfocita T, limfocita B i NK-stanica koji u konačnici uzrokuju upalu, fibrozu, sklerozu i atrofiju kože, sluznice usta, suznih žlijezda, pluća, gastrointestinalnog trakta, jetre, mišića i zglobova.² Glukokortikoidi u dozi od 1 mg/kg tjelesne težine u kombinaciji s inhibitorom kalcineurina ciklosporinom A prva su linija liječenja cGVHD-a.¹ Za bolesnike koji ne odgovaraju na ovo liječenje još ne postoji

standardni općeprihvaćen pristup pa se u drugoj liniji liječenja primjenjuje više imunosupresivnih lijekova: mofetil mikofenolat, sirolimus, azatioprin, pentostatin i monoklonska antitijela protiv limfocita T ili limfocita B. Perzistirajući

* Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb (dr. sc. Ines Bojanić, dr. med.; dr. sc. Sanja Mazić, dr. med.; dr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med.), Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta, KBC Zagreb (Ranka Serventi Seiwerth, dr. med.; prof. dr. sc. Boris Labar, dr. med.), Zavod za imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb (Klara Dubravčić, dipl. ing.; prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. I. Bojanić, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: ines.bojanic@kbc-zagreb.hr

Primljeno 26. listopada 2012., prihvaćeno 26. studenoga 2013.

cGVHD dovodi do trajnih oštećenja tkiva i invaliditeta, a primjena glukokortikoida do teških nuspojava kao što su oportunističke infekcije, intolerancija glukoze koja zahtijeva primjenu inzulina, avaskularna nekroza glave femura, hipertenzija, atrofija kože, katarakta, osteoporozna, a u djece zastoj rasta.²

Ekstrakorporalna izvantjelesna fotofereza (EF) već se 20 godina rabi u liječenju cGVHD-a u bolesnika u kojih unatoč primjeni visokih doza imunosupresivnih lijekova nije uspostavljena kontrola bolesti. Postupak EF sastoji se od tri dijela: 1. prikupljanja mononuklearnih stanica iz periferne krvi bolesnika postupkom leukafereze, 2. dodavanja fotoaktivne tvari 8-metoksiporalena (8-MOP) prikupljenim mononuklearnim stanicama i njihovo izlaganje ultraljubičastim zrakama A (UVA) i 3. transfuzije ozračenih stanica natrag u cirkulaciju bolesnika. Danas je EF prihvaćena kao sigurna i neškodljiva imunoterapijska metoda koja djeluje imunomodulatorno na cGVHD, a bez generalizirane imunosupresije.²

Cilj istraživanja bio je procijeniti klinički i imunomodulatorni učinak postupka EF u bolesnika s cGVHD-om, kao i

praćenje neželjenih reakcija. Osim toga, analiziran je i učinak EF-a na vrijednosti subpopulacija limfocita u krvi bolesnika, kao i na tijek bolesti.

Bolesnici

U razdoblju od 2007. do 2011. godine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb postupkom EF-a liječeno je 7 bolesnika u kojih se nakon transplantacije KMS-a razvio cGVHD. U toj je skupini bilo 5 muškaraca i 2 žene životne dobi između 12 i 69 godina (medijan 29 godina). Dva su bolesnika liječena transplantacijom KMS-a zbog aplastične anemije, dva zbog akutne limfatičke leukemije i tri zbog akutne mijeloične leukemije. Četiri su bolesnika transplantirana koštanom srži srodnih davatelja, dva bolesnika perifernim KMS-om srodnog, a jedna bolesnica perifernim KMS nesrodnog davatelja. Svi davatelji bili su ženskog spola. U svih se bolesnika cGVHD manifestirao kožnim promjenama u kombinaciji sa simptomima drugih organskih sustava, primjerice smanjenom pokretljivošću zglobova,

Tablica 1. Obilježja bolesnika, transplantata KMS-a i postupaka EF-a
Table 1. Patient characteristics, HSC transplant and ECP data

Spol, dob (god.) / Sex, age (yrs)	Dijagnoza / Diagnosis	Izvor KMS-a / HSC source	Srodstvo davatelja / Donor relation	Simptomi cGVHD-a / cGVHD symptoms	Prethodno liječenje cGVHD-a / Prior cGVHD treatment	Ukupan br. EF-a / Total No. of ECP	Trajanje liječenja EF-om (mj.) / ECP treatment duration (months)	Odgovor na EF / Response to ECP	Stanje pri posljednjem praćenju / Status at last follow-up
M 24 M 24	AA	KS BM	sestra / sister	koža: generalizirani eritem, suhe oči, suhoća i ulceracije sluznice usne šupljine, anoreksija, proljevaste stolice, gubitak TT / skin: erythema, dry eyes, xerostomia, oral mucosal ulceration, anorexia, diarrhea, weight loss	prednizon, CSA, MMF / prednisone, CSA, MMF	52	13	poboljšanje / improved	živ / alive
M 12 M 12	AA	PKMS PBSC	sestra / sister	koža: sklerodermiformne promjene, kontraktura zglobova / skin: sclerodermatous changes, joint contractures	prednizon, CSA, MMF / prednisone, CSA, MMF	127	58	poboljšanje, stabilno / improved stable	živ / alive
Ž 29 F 29	ALL	KS BM	sestra / sister	koža: sklerodermiformne promjene, anoreksija, proljevaste stolice, gubitak TT / skin: sclerodermatous changes, anorexia, diarrhea, weight loss	prednizon, CSA / prednisone, CSA	55	12	poboljšanje, stabilno / improved stable	živ / alive
Ž 69 F 69	AML	PKMS PBSC	nesrodni / unrelated	koža: sklerodermiformne promjene, suhe oči, kontraktura zglobova / skin: sclerodermatous changes, dry eyes, joint contractures	prednizon, CSA / prednisone, CSA	28	7	djelomično poboljšanje / partial response	živ / alive
M 18 M 18	AML	KS BM	sestra / sister	koža: generalizirani eritem, proljevaste stolice, gubitak TT / skin: erythema, diarrhea, weight loss	prednizon, MMF, ATG / prednisone, MMF, ATG	13	2	pogoršanje / worsened	umro / deceased
M 36 M 36	ALL	KS BM	sestra / sister	koža: sklerodermiformne promjene, kontraktura zglobova / skin: sclerodermatous changes, joint contractures	prednizon, CSA, MMF / prednisone, CSA, MMF	29	3	djelomično poboljšanje / partial response	živ / alive
M 58 M 58	AML	PKMS PBSC	sestra / sister	koža: generalizirani eritem, suhe oči, suhoća i ulceracije sluznice usne šupljine, anoreksija, gubitak TT / skin: erythema, dry eyes, xerostomia, oral mucosal ulceration, anorexia, weight loss	prednizon, CSA, MMF / prednisone, CSA, MMF	37	5	poboljšanje, stabilno / improved stable	živ / alive

AA=aplastična anemija/aplastic anemia; AML=akutna mijeloična leukemija/acute myeloid leukemia; ALL=akutna limfatička leukemija/acute lymphatic leukemia; KS=koštana srž/BM=bone marrow; PKMS=periferna krvotvorne matične stanice; PBSC=peripheral blood stem cells; CSA=ciklosporin A / cyclosporin A; MMF=mofetil mikofenolat / mofetil mycophenolate; ATG=antitimocitni globulin / antithymocyte globulin

suhoćom očiju, suhoćom i ulceracijama sluznice usne šupljine te proljevastim stolicama. U liječenju cGVHD-a primijenjena je kombinacija više imunosupresivnih lijekova uz prednizon čija je primjena bila praćena teškim neželjenim reakcijama kao što su poremećen metabolizam glukoze od intolerancije do dijabetesa melitusa te osteoporoza. Liječenje EF-om započelo je od 8 do 68 mjeseci (medijan 12 mjeseci) nakon transplantacije KMS-a. Obilježja bolesnika i transplantata KMS-a prikazana su u tablici 1.

Metode

Postupak EF-a proveden je »off-line« metodom.³ Mononuklearne stanice prikupljene su leukaferozom staničnim separatorom COBE Spectra poluautomatskim postupkom (MNC-program, verzija 6.0) (Caridian BCT, SAD). Obilježja postupka i produkta leukaferoze prikazana su u tablici 2. Venski je pristup u 4 bolesnika ostvaren putem perifernih

Tablica 2. Obilježja postupka i produkta leukaferoze
Table 2. Leukapheresis procedure and product characteristics

	medijan (raspon) median (range)
Broj leukaferoze / bolesniku No. of leukapheresis / patient	37 (13–127)
Trajanje leukaferoze (min) Leukapheresis duration (min)	170 (167–273)
Obraden volumen pune krvi (mL) Inlet whole blood volume (mL)	8016 (4732–18199)
Ulazni protok krvi (mL/min) Inlet whole blood flow rate (mL/min)	39,6 (29,3–58,4)
Volumen produkta leukaferoze (mL) Volume of leukapheresis product (mL)	153 (63–202)
Prinos stanica u produktu leukaferoze Yield of cells per single leukapheresis procedure	
TNC ($\times 10^8$ /kg) TNC ($\times 10^8$ /kg)	1,21 (0,45–5,79)
MNC ($\times 10^7$ /kg) MNC ($\times 10^7$ /kg)	11,1 (4,0–50,1)
Limfociti ($\times 10^8$ /kg) Lymphocytes ($\times 10^8$ /kg)	0,77 (0,27–4,63)
Htc (%) nakon razrjeđenja fiziološkom otopinom Htc (%) post saline dilution	1,07 (0,01–2,13)

TNC = ukupan broj stanica s jezgrom, total nucleated cells; MNC = mononuklearne stanice, mononuclear cells; Htc = hematokrit, hematocrit

vena, a u 3 je bolesnika za postupak leukaferoze bilo potrebno postaviti dvoluminalni centralni venski kateter. Svakom leukaferozom ukupni volumen krvi bolesnika obrađen je dva puta, a cilj je bio prikupiti više od 3×10^7 limfocita po kg tjelesne težine. Tijekom leukaferoze bolesnici su za sprječavanje pojave simptoma hipokalcemije primali infuziju kalcij glukonata.

Prikupljene mononuklearne stanice prenesene su u vrećicu propusnu za UVA-zrake Extracorporeal UVA Bag Set (Cell Max GmbH, Njemačka) i razrijeđene fiziološkom otopinom do volumena od 300 mL nakon čega je dodano 100.000 ng fotoaktivne supstancije 8-MOP (Gerot, Austrija). Stanice su potom ozračene aparatom za zračenje (PUVA Combi-Light UVA Illuminator, Njemačka) UVA-zrakama valne duljine 350 nm dozom od 2 J/cm². Ozračene stanice transfundirane su natrag bolesniku. Bolesnici su pažljivo praćeni tijekom leukaferoze i reinfuzije uz bilježenje neželjenih reakcija.

EF su provedene ambulantno, uvijek dva dana za redom: prvih mjesec dana svaki tjedan, sljedeća 2 mjeseca svaki

drugi tjedan, a potom jednom na mjesec. Svi su bolesnici uz EF prema potrebi primali imunosupresivnu terapiju, koja je postepeno smanjivana ovisno o kliničkom odgovoru.

U uzorcima krvi bolesnika uzetim prije i nakon svakog postupka EF-a te u produktu leukaferoze prije i nakon ozračivanja analiziran je broj leukocita, mononuklearnih stanica, trombocita i hematokrit. Subpopulacije limfocita T (CD3+, CD3+4+, CD3+8+, omjer CD4+8+ stanica), limfocita B (CD 19+), i NK-stanice (CD56+) u perifernoj krvi analizirane su jednom na mjesec tijekom provođenja EF-a. Kod jednog bolesnika zbog tehničkih razloga nisu određivane subpopulacije limfocita. Broj krvnih stanica i diferencijalna krvna slika analizirani su hematološkim brojačem Advia 120 (Bayer, SAD), dok su subpopulacije limfocita analizirane tehnikom protočne citometrije protočnim citometrom FACS Calibur (Becton Dickinson, SAD). Rezultati su izraženi kao medijan i raspon.

Rezultati

U 7 bolesnika sveukupno je proveden 341 postupak EF-a; medijan 37 postupaka EF-a po bolesniku (raspon 13–131). Medijan trajanja liječenja postupkom EF-a iznosio je 10 mjeseci (raspon 2 do 58 mjeseci). U tablici 1. prikazani su podaci o postupcima EF-a i njihovu učinku na simptome cGVHD-a. U 6/7 bolesnika došlo je do poboljšanja ili stabilizacije promjena kože te bolje pokretljivosti zglobova. Potpuni odgovor, tj. potpuno povlačenje kožnih promjena zabilježeno je u 4/7 bolesnika, a djelomičan odgovor u 2/7 bolesnika. U dva bolesnika s promjenama sluznice usne šupljine došlo je tijekom EF-a do potpunog oporavka. Kliničko je poboljšanje nastupilo 2 do 3 mjeseca od početka EF-a. Liječenje EF-om omogućilo je potpuni prestanak primjene glukokortikoida u 3 bolesnika, u 2 je omogućilo sniženje doze glukokortikoida (više od 50% od početne doze lijeka), dok je jedan bolesnik unatoč primjeni EF-a ostao ovisan o visokim dozama glukokortikoida. Jedan bolesnik umro je zbog progresije simptoma cGVHD-a 2 mjeseca od početka liječenja EF-om. Vrijednosti subpopulacija limfocita prije početka liječenja EF-om i nakon završetka EF-a prikazane su u tablici 3.

Neželjene reakcije javile su se tijekom 17/341 (4,9%) postupaka EF-a. U 3 bolesnika venski se pristup nije mogao ostvariti putem perifernih vena te je morao biti postavljen centralni venski kateter. U jednog od tih bolesnika liječenje EF-om prekinuto je zbog infekcije katetera, a u drugog je nakon 3 mjeseca došlo do oštećenja katetera te je bilo potrebno postaviti novi kateter. Unatoč infuziji kalcija, blagi simptomi hipokalcemije javili su se tijekom 8 leukaferoze. Do porasta temperature došlo je u jednog bolesnika nakon četvrte reinfuzije ozračenih stanica. Dva su bolesnika liječena zbog infektivnih komplikacija na plućima, a tada su uz provođenje EF-a liječeni prednizolonom u dozi od 1 mg/kg TT i mofetil mikofenolatom.

Unatoč smirivanju simptoma cGVHD-a, dva su bolesnika na vlastiti zahtjev prekinula daljnje liječenje EF-om nakon 7, odnosno 13 mjeseci jer su postupak smatrali prezahtjevnim.

Rasprava

Na temelju opažanja da limfociti T propadaju pod utjecajem 8-MOP i ultraljubičastog zračenja Edelson i sur.⁴ iznašli su metodu ekstrakorporalne fotofereze koja omogućuje izdvajanje bolesnikovih stanica iz cirkulacije, njihovo izlaganje fotoaktivirajućoj supstanciji psoralenu i ultraljubičastom svjetlu te vraćanje bolesniku. EF je prvo

Tablica 3. Subpopulacije limfocita periferne krvi prije početka liječenja EF-om i nakon završetka EF-a
 Table 3. Peripheral blood lymphocyte subsets at start of ECP and after ECP

Spol, dob (god) / Sex, age (yrs)		Subpopulacije limfocita / Lymphocytes subsets (normalan raspon / normal range)				
		CD3+4+ (30–55%)	CD3+8+ (16–39%)	CD4+/CD8+ omjer / ratio (0,9–3,4)	CD19+ (4–14%)	CD56+ (10–31%)
M 24	prije EF-a before ECP	26 ↓	37 ↔	0,7 ↓	10 ↔	17 ↔
M 24	nakon EF-a after ECP	18 ↓	29 ↔	0,8 ↓	19 ↑	7 ↓
M 12	prije EF-a before ECP	19 ↓	16 ↔	1,2 ↔	22 ↑	30 ↔
M 12	nakon EF-a after ECP	20 ↓	14 ↓	1,4 ↔	34 ↑	22 ↔
Ž 29	prije EF-a before ECP	14 ↓	46 ↑	0,3 ↓	27 ↑	7 ↓
F 29	nakon EF-a after ECP	41 ↔	37 ↔	1,1 ↔	8 ↔	14 ↔
Ž 69	prije EF-a before ECP	42 ↔	42 ↑	0,5 ↓	2 ↓	6 ↓
F 69	nakon EF-a after ECP	50 ↔	42 ↑	1,2 ↔	2 ↓	11 ↔
M 36	prije EF-a before ECP	22 ↓	33 ↔	0,6 ↓	35 ↑	6 ↓
M 36	nakon EF-a after ECP	16 ↓	18 ↔	0,9 ↔	7 ↔	18 ↔
M 58	prije EF-a before ECP	11 ↓	74 ↑	0,1 ↓	5 ↔	9 ↓
M 58	nakon EF-a after ECP	16 ↓	57 ↑	0,4 ↓	4 ↔	16 ↔

↔ = vrijednosti unutar normalnog raspona / values within normal range

↑ = povišene vrijednosti u odnosu na normalan raspon / above normal range

↓ = snižene vrijednosti u odnosu na normalan raspon / below normal range

uspješno primijenjena za liječenje T-staničnog kožnog limfoma,⁴ a i danas je prihvaćena kao standardna metoda liječenja bolesnika s eritodermijskom fazom *mycosis fungoides*.² Potom je EF pokazala uspjeh u liječenju refrakternih oblika autoimunskih bolesti sistemske skleroze i reumatoidnog artritisa.⁵ Budući da cGVHD ima brojne kliničke i histopatološke sličnosti s autoimunskim bolestima, više je autora primijenilo EF za liječenje cGVHD-a u bolesnika koji su bili refraktorni na liječenje glukokortikoidima.^{6,7} Cilj uvođenja EF u terapiju cGVHD-a jest imunomodulacijskim djelovanjem postići kontrolu bolesti ili barem omogućiti sniženje doze glukokortikoida i time izbjeći njihove neželjene učinke.

Od prvog izvješća Owisanowskog i sur. o uspješnoj primjeni EF-a u bolesnika s cGVHD-om objavljeno je više retrospektivnih te dva prospektivna istraživanja o učinkovitosti EF-a u bolesnika s cGVHD-om rezistentnim na glukokortikoide.^{8–11} Retrospektivna su istraživanja pokazala da je liječenje EF-om uspješno u dvije trećine bolesnika s cGVHD-om ovisnih o glukokortikoidima, a da do kliničkog poboljšanja dolazi od 3 do 6 mjeseci od početka liječenja.^{10,12} U slučaju cGVHD-a kože i sluznice usne šupljine potpuni odgovor postignut je u 75–100% bolesnika, jetre u 30–80%, zglobova u 50%, a u cGVHD-u gastrointestinalnog trakta u 0–50% bolesnika.^{8–10,12} Rezultati multicentričnoga prospektivnog randomiziranog istraživanja, koje je provedeno u bolesnika s cGVHD-om kože rezistentnih na liječenje glukokortikoidima pokazali su nakon 12 tjedana statistički značajnu razliku u uspjehu liječenja između skupine bolesnika liječene standardnom imunosupresivnom terapijom (N=47), u odnosu na skupinu koja je uz to dodatno liječena i po-

stupkom EF-a (N=48).¹³ Naime, u 40% bolesnika koji su uz standardno liječenje liječeni i postupkom EF-a nakon 12 tjedana došlo je do značajnog smanjenja ili potpunog nestanka promjena na koži, dok je u drugoj skupini isti učinak postignut samo u 10% bolesnika (p<0,001). U navedenom istraživanju, kao i u brojnim drugima, primjena EF-a omogućila je sniženje doze glukokortikoida i poboljšala kvalitetu života bolesnika. Daljnju primjenu EF-a tijekom 24 tjedna pratilo je brže povlačenje promjena na koži. Isti su autori proveli istraživanje u kojem je sudjelovalo 29 ispitanika koji su inicijalno bili randomizirani samo na standardno liječenje.¹⁴ Nakon 24 tjedna liječenja postupkom EF-a u 31% bolesnika postignut je potpuni ili djelomični odgovor, a u 33% bolesnika doza glukokortikoida snižena je za više od 50%. Što se tiče ostalih organa, najbolji su rezultati postignuti u bolesnika s promjenama sluznice usne šupljine koje su u 70% bolesnika nestale nakon 24 tjedna primjene EF-a.

U našoj skupini od sedam bolesnika EF je većinom povoljno utjecala na simptome cGVHD-a pa je tako u 6 bolesnika došlo do poboljšanja i/ili stabilizacije sklerodermatoznih promjena te do bolje pokretljivosti zglobova. U 4 bolesnika nastupilo je potpuno povlačenje kožnih promjena, a djelomičan odgovor bez progresije simptoma postignut je u još 2 bolesnika. U 2 bolesnika koji su imali ulceracije sluznice usne šupljine, a koje su onemogućavale uzimanje hrane, promjene su se u cijelosti povukle tijekom primjene EF-a. Do kliničkog poboljšanja došlo je 2 do 3 mjeseca nakon početka EF-a. U naših je bolesnika EF također, uz kliničko poboljšanje, omogućio značajno smanjenje ili prestanak primjene glukokortikoida.

Prikupljanje mononuklearnih stanica za potrebe EF-a tehnički je zahtjevno jer treba prikupiti pripravak s velikim brojem limfocita koji sadržava minimalnu količinu eritrocita. Ciljni broj limfocita prikupljen je u svih naših bolesnika. Kod nekih je to bilo teško postići zbog malenog broja leukocita u perifernoj krvi prije leukafereze, što je zahtijevalo modifikaciju i produženje postupka prikupljanja stanica leukaferezom. Hematokrit je u našim pripravcima leukafereze bio nizak, što je izuzetno važno jer veći udio eritrocita onemogućuje UVA-zrakama pristup do ciljnih mononuklearnih stanica i time oslabljuje učinak ozračivanja.

Mehanizam djelovanja EF-a nije potpuno razjašnjen. Istraživanja su pokazala da tijekom EF-a dolazi do apoptoze limfocita T, diferencijacije monocita u dendritičke stanice koje potom fagocitiraju apoptotske limfocite, promjene obrasca proizvodnje citokina iz proupalnih u protuupalne citokine, poticanja stvaranja regulatornih limfocita T uz uspostavljanje imunostolerancije.^{2,15,16} S obzirom na to da je tijekom EF-a manje od 10% cirkulirajućih limfocita izloženo djelovanju 8-MOP i UVA-zračenju, malo je vjerojatno da je apoptoza limfocita jedini mehanizam odgovoran za opaženi terapijski učinak.¹⁷ Postupak EF-a ne inducira apoptozu monocita, već fotoaktivacija izaziva njihovu diferencijaciju u nezrele plazmacitoidne dendritičke stanice sposobne fagocitirati apoptotske limfocite. Aktivnost fotoaktiviranih monocita i fagocitoza apoptotskih limfocita uzrokuju promjene imunostolnog odgovora putem različitih efektorskih mehanizama koji uključuju dendritičke stanice, regulacijske stanice i promjenu obrasca citokinskog odgovora. Izvijesteno je da liječenje EF-om uzrokuje brojne promjene imunostolnog statusa bolesnika, uključujući normalizaciju omjera CD4+/CD8+ stanica, povećanje broja CD4+CD25+ regulacijskih limfocita T, povećanje broja CD3-/CD56+ NK-stanica, smanjenje sposobnosti stanica koje predočavaju antigen i dendritičkih stanica u stimulaciji limfocita T te supresiju CD8+ efektorskih limfocita T.^{15,18,19} U bolesnika s razvijenim cGVHD-om opažen je deficit regulacijskih limfocita T, a normalizacija njihovih vrijednosti povezana je s kliničkim poboljšanjem.²⁰⁻²² Alcindor i sur. i Seaton i sur. izvjestili su o normalizaciji omjera CD4+/CD8+ stanica zbog smanjenja broja CD8+ stanica te o povećanju broja NK-stanica.^{16,23} U naših bolesnika omjer CD4+/CD8+ stanica bio je snižen prije početka EF-a, dok se tijekom EF-a normalizirao u bolesnika u kojih je došlo do poboljšanja kliničkog stanja; slično je opaženo i za kretanje broja NK-stanica.

Liječenje EF-om primjenjuje se i u odraslih bolesnika i u djece.²⁴ Naš najmlađi bolesnik liječen EF-om imao je 12 godina, a najstarija bolesnica 69 godina, što upućuje na to da nema dobne granice za primjenu ovog postupka. Bolesnici su postupke EF-a dobro podnosili uz mali broj blagih nuspojava. Više je radova pratilo učestalost nuspojava tijekom EF-a te je izviješteno o niskoj incidenciji nuspojava.²⁵ Nuspojave koje se javljaju tijekom leukafereze nisu specifične za EF, obično su blage i reverzibilne. Osim uobičajenih problema s venskim pristupom valja istaknuti da tijekom EF-a volumen krvi u ekstrakorporalnoj cirkulaciji iznosi 250 mL, što odrasli bolesnici dobro podnose, dok je u djece potrebna dodatna pozornost. Nuspojave izazvane toksičnošću citrata sprječavaju se preventivnom infuzijom kalcija. Budući da se na početku liječenja EF primjenjuju intenzivno svaki tjedan, može se javiti anemija i/ili trombotopenija koja može zahtijevati transfuzijsko liječenje. Volumen ozračenih stanica razrijeđenih fiziološkom otopinom zbog potreba zračenja može izazvati volumno preoptereće-

nje u djece, kao i u odraslih bolesnika s hipertenzijom, zatajanjem bubrežne funkcije i sl., što zahtijeva primjenu diuretika ili antihipertenziva. U jednog je našeg bolesnika tijekom četiriju postupaka EF-a nakon reinfuzije ozračenih stanica opaženo povišenje temperature, što je vjerojatno posljedica otpuštanja citokina iz fotomodificiranih stanica.⁵ Dva su bolesnika tijekom provođenja EF-a liječena zbog infektivnih komplikacija na plućima, koje vjerojatno nisu direktna posljedica EF-a, već imunopareze koja se nalazi u bolesnika s cGVHD-om liječenih imunosupresivnom terapijom. Važno je istaknuti da do danas u literaturi nema izvješća o povećanoj učestalosti infekcija ili malignih bolesti u bolesnika koji su liječeni EF-om tijekom nekoliko godina.

Iako se EF već 20 godina rabi za liječenje cGVHD-a, ipak se još traže odgovori na nekoliko pitanja. Organizacija liječenja EF-a zahtjevna je osobito za bolesnike koji žive izvan mjesta provođenja liječenja EF-om zbog potrebe čestog i redovitog dolaska na postupak. Stoga je suradljivost i motivacija bolesnika tijekom liječenja EF vrlo važna. Kao što je i naše istraživanje potvrdilo, prvi se rezultati javljaju nakon 2 do 3 mjeseca, što zahtijeva strpljivost i bolesnika i liječnika koji su indicirali primjenu postupka EF-a. Dvoje naših bolesnika prekinulo je liječenje EF-om na vlastiti zahtjev nakon 7, odnosno 13 mjeseci iako je došlo do kliničkog poboljšanja jer su postupak smatrali prezahtjevnim. Liječenje EF-om traje prilično dugo, godinu dana ili čak dulje, a tijekom tog vremena potrebno je održati odgovarajući venski pristup. Venski je pristup optimalno ostvariti putem perifernih vena. Na žalost to nije uvijek moguće postići jer je riječ o bolesnicima koji su prethodno primili veliku količinu intravenske terapije koja je oštetila vene, a i promjene na koži izazvane cGVHD-om onemogućavaju zadovoljavajući pristup perifernim venama. Tako je i kod naša tri bolesnika morao biti postavljen centralni venski kateter, što značajno smanjuje kvalitetu života bolesnika.

Budući da se EF primjenjuje s različitom učestalosti ovisno o centru u kojem se provodi, teško je sa sigurnosti procijeniti potreban broj ciklusa u mjesecu i potrebno trajanje liječenja pa se postavlja pitanje standardnog protokola liječenja cGVHD-a postupkom EF-a. Smatra se da valja odustati od daljnjeg EF-a i potražiti druge oblike liječenja ako nakon 3 mjeseca redovite primjene EF-a ne nastupi barem djelomično poboljšanje. Greineix i sur. randomiziranim su kontroliranim istraživanjem pokazali da se protokol primjene EF-a treba dodatno intenzivirati provođenjem ciklusa od dva postupka EF-a svaki tjedan prva 3 mjeseca, a potom 2 puta na mjesec najmanje sljedeća 3 mjeseca, što za bolesnike može biti zahtjevno, ali rezultati pokazuju da je učinkovito.^{13,14}

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da liječenje postupkom EF-a povoljno utječe na simptome cGVHD-a i omogućuje sniženje doze kortikosteroida uz poboljšanje kvalitete života bolesnika i prihvatljivu učestalost nuspojava. Stoga, iako je riječ o zahtjevnom načinu liječenja, EF se može preporučiti bolesnicima s cGVHD-om koji ne odgovaraju na standardno liječenje.

LITERATURA

1. *Devergie A.* Graft versus host disease. U: Apperley J, Carreras E, Gluckman E i sur, ur. *Haematopoietic stem cell transplantation*. Paris: ESH; 2008, str. 218-35.
2. *Szczepiorkowski M, Winters J, Bandarenko N i sur.* Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the apheresis applications committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher* 2010;25:83-177.

3. *Andreu G, Leon A, Heshmati F i sur.* Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci* 1994;15:443–54.
4. *Edelson R, Berger C, Gasparro F i sur.* Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N Engl J Med* 1987; 316:297–303.
5. *Knobler R, Barr M, Couriel D i sur.* Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:652–65.
6. *Ulrich SE.* Photoinactivation of T-cell function with psoralen and UVA radiation suppresses the induction of experimental murine GVHD across major histocompatibility barriers. *J Invest Dermatol* 1991;96: 303–8.
7. *Dippel E, Goerd S, Orfanos C.* Long-term extracorporeal photoimmunotherapy for treatment of chronic cutaneous GVHD: observations in four patients. *Dermatology* 1999;198:370–4.
8. *Arora M.* Therapy of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21:271–9.
9. *Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S i sur.* Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: second-line treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;17:1–17.
10. *Greinix HT, Socie G, Bacigalupo A i sur.* Assessing the potential role of photopheresis in hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:265–73.
11. *Owsianowski M, Gollnick H, Siegert W i sur.* Successful treatment of chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photopheresis. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:845–8.
12. *Yoo E, Rook A, Elenitsas R i sur.* Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 1996;107:235–42.
13. *Flowers ME, Apperley JF, van Besien K.* A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2667–74.
14. *Greinix H, van Besien K, Elmagacli A i sur.* Progressive improvement in cutaneous and extracutaneous chronic graft-versus-host disease after a 24-week course of extracorporeal photopheresis – results of a crossover randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1775–82.
15. *Craciun LI, Stordeur P, Schandene L i sur.* Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft versus host disease. *Transplantation* 2002;74:995–1000.
16. *Alcindor T, Gorgun G, Miller KB i sur.* Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft versus host disease. *Blood* 2001;98:1622–5.
17. *Kaloyannidis P, Mallouri D.* The role of the extracorporeal photopheresis in the management of the graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* 2012;46:211–9.
18. *Berger C, Hanlon D, Kanada D i sur.* Transimmunisation, a novel approach for tumor immunotherapy. *Transfus Apher Sci* 2002;26:205–16.
19. *Di Renzo M, Sbano P, De Aloe G i sur.* Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin Exp Immunol* 2008;151:407–13.
20. *Rieger K, Loddenkemper C, Maul J i sur.* Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GVHD. *Blood* 2006;107:1717–23.
21. *Zorn E, Kim HT, Lee SJ i sur.* Reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903–11.
22. *Clark FJ, Gregg R, Piper K i sur.* Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25 high regulatory T cells. *Blood* 2004;103:2410–6.
23. *Seaton ED, Szydlo RM, Kanfer E i sur.* Influence of extracorporeal photopheresis on clinical and laboratory parameters in chronic graft-versus-host disease and analysis of predictors of response. *Blood* 2003; 102:1217–23.
24. *Kanold J, Merlin E, Halle P i sur.* Photopheresis in pediatric graft-versus-host-disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* 2007;47:2276–89.
25. *Scarisbrick JJ, Taylor P, Holtick U i sur.* U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2008;158:659–78.

* * *

Vijesti News

Hrvatsko društvo umirovljenih liječnika
Hrvatskoga liječničkog zbora
HDUL HLZ

Pozivamo umirovljene liječnike da nam se pridruže!

- stručna predavanja
- druženje uz kavu
- izleti
- kulturne manifestacije
- pomoć potrebitim kolegama
- udruga »Andrija Štampar«
- u pripremi III. knjiga HDUL
- rješavanje naših problema



Pridruži se! Budi naš član!

Informacije: 098-350 108 ,098-71 25 99 , 098-457 117

E-mail: brinarpeter@gmail.com, kaiczvonimir@gmail.com, ankica.salamon@gmail.com

Prim. mr. sc. Peter Brinar, dr. med
Predsjednik HDUL HLZ