

Lékařská fakula Univerzity Palackého v Olomouci

**Hladina neutrofilů ve slině jako pomocný ukazatel úspěšnosti přihojení
neutrofilů po autologní transplantaci periferních krvetvorných buněk**

doktorandská dizertační práce

MUDr. Richard Pink

Olomouc 2009

Použité zkratky

B – MALT	B cell Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
CA	Carcinoma Antigen
CEA	Carcinoma Embryonal Antigen
CMV	Cytomegalovirus
CPITN	Community Periodontal Index of Treatment Need
DNA	Deoxyribonukleová Kyselina
EB	virus Epstein - Barové
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzym-linked ImmunoSorbent Assay
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GICA	Gastrointestinal Carcinoma-Associated Antigen
GIT	Gastrointestinální Trakt
GM-GSF	Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor
GVHD	Graft Versus Host Disease
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigens
HPV	Human Papiloma Virus
IL	Interleukin
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MH	Morbus Hodgkin
mM	milimol
MM	Mnohočetný Myelom
mRNA	mediátorová Ribonukleová Kyselina
MRSA	Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus
MUC	Human Mucin Gene
NCI – CTC	National Cancer Institut- Common Toxicity Criteria
NHL	Non-Hodgkinský lymfom
OM	Orální mukositida
OPG	Ortopantomogram
OZK	Odstranění zubního kamene
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBI	Papila Bleeding Index
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern Recognition Receptors
RNA	Ribonukleová Kyselina
RIA	Radioimmunoassay
SELDI – TOF – MS	Surface-enhanced Laser Desorption Ionisation-Time of Flight- Mass- Spectrometry
TGF	Tumor Growth Factor
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
WHO	World Health Organization

Obsah:

1. Úvod.....	4
2. Slina.....	5
2.1. Fyziologie sliny.....	5
2.2. Slina jako diagnostické medium.....	12
3. Bakteriální flóra dutiny ústní.....	22
4. Sliznice dutiny ústní.....	24
4.1. Anatomie, histologie.....	24
4.2. Slizniční imunita.....	25
5. Porušení slizniční bariéry.....	29
5.1. Porušení slizniční bariéry při transplantaci kostní dřeně.....	30
5.2. Transplantace kostní dřeně.....	30
5.2.1. Autologní transplantace kostní dřeně.....	33
5.2.1.1. Provedení autologní transplantace.....	34
5.2.2. Alogenní transplantace kostní dřeně.....	35
5.2.2.1. Provedení alogenní transplantace.....	38
5.3. Orální mukozitída jako nežádoucí účinek chemoterapie a radioterapie.....	39
5.3.1. Klinický obraz mukozitídy.....	39
5.3.2. Diagnostika orální mukozitídy.....	40
5.3.3. Profylaxe a léčba orální mukozitídy v souvislosti s transplantací kostní dřeně.....	42
6. Cíle práce.....	46
7. Materiál a metodika.....	46
8. Výsledky.....	52
9. Diskuse.....	60
10. Závěr.....	64
11. Souhrn.....	65
12. Literatura.....	66
13. Poděkování.....	70

1. Úvod

Dutina ústní je důležitou součástí horního aerodigestivního traktu. Příjem potravy a dýchání jsou základními podmínkami života. Rozmanitost úkolů, které připadají ústní dutině určuje její význam a i závažnost jejího případného onemocnění. Orální zdraví je nedílnou součástí celkového zdravotního stavu každého jednotlivce: organismus tedy může zpětně ovlivňovat ústní dutinu a naopak. Je známo, že při některých onemocněních (anemie, diabetes, avitaminózy, maligních onemocněních krvetvorných orgánů) se v ústech objevují chorobné změny, které často předcházejí projevům systémovým (Obr. 1). Pestrost patologických procesů v ústech vyplývá zejména:

- z intenzivního působení zevních vlivů, kterým je dutina ústní vystavena více než jiné části zažívacího traktu.
- z citlivosti ústních tkání vůči systémovým onemocněním, hlavně metabolické povahy.
- ze specifity ústního prostředí, která je dána jeho funkční i morfológickou odlišností.

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující prostředí dutiny ústní patří zejména mikroskopická skladba ústní sliznice, slizniční imunita, přítomnost sliny („orální tekutiny“), zubů, a orální bakteriální flóry. Ústní dutina disponuje bohatou škálou obranných mechanismů s kladným dopadem na procesy hojení různých poranění.



Obr. 1.
Klinická manifestace onemocnění v dutině ústní

2. Slina

2.1. Fyziologie sliny

Slina je sekretem slinných žláz, který zajišťuje stabilitu prostředí dutiny ústní. „Orální tekutina“ je složena z vlastní sliny, cervikální tekutiny obsažené v dentogingiválním sulku, slizničního transudátu, buněčného detritu, bakterií a zbytků potravy (Tab. 1)¹.

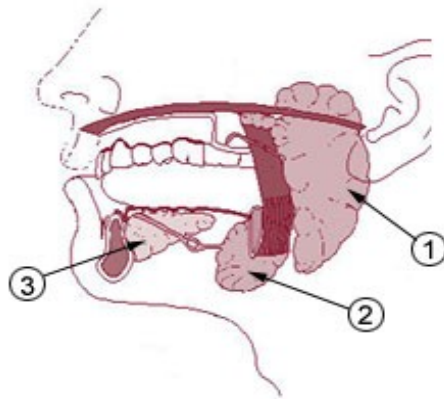
Sulkální tekutina je transudátem z cévní pleteně uložené pod spojovacím epitelem na dně gingiválního žlábků, který je orálně ohraničen sklovinou a cementem zubu, vestibulárně orálním epitelem sulku a apikálním směrem volným povrchem spojovacího epitelu. U klinicky zdravé gingivy nacházíme velmi málo sulkální tekutiny, zatímco s rozvíjejícím se zánětem gingivy se její množství zvětšuje. Sulkální tekutina má působí jako lubrikační medium sulku a díky buňkám přirozené imunity má zároveň antimikrobiální účinek.

Základem sliny je intersticiální tekutina z krevních kapilár, která dále vstupuje do duktálního systému, kde je modifikována z isotonicke tekutiny na hypotonickou² (Obr. 4). Slinné žlázy rozdělujeme podle velikosti na velké (gl. parotis, gl. submandibularis a gl. sublingualis) a malé, lokalizované ve sliznici rtů, tváře, jazyka a patra (Obr. 2).

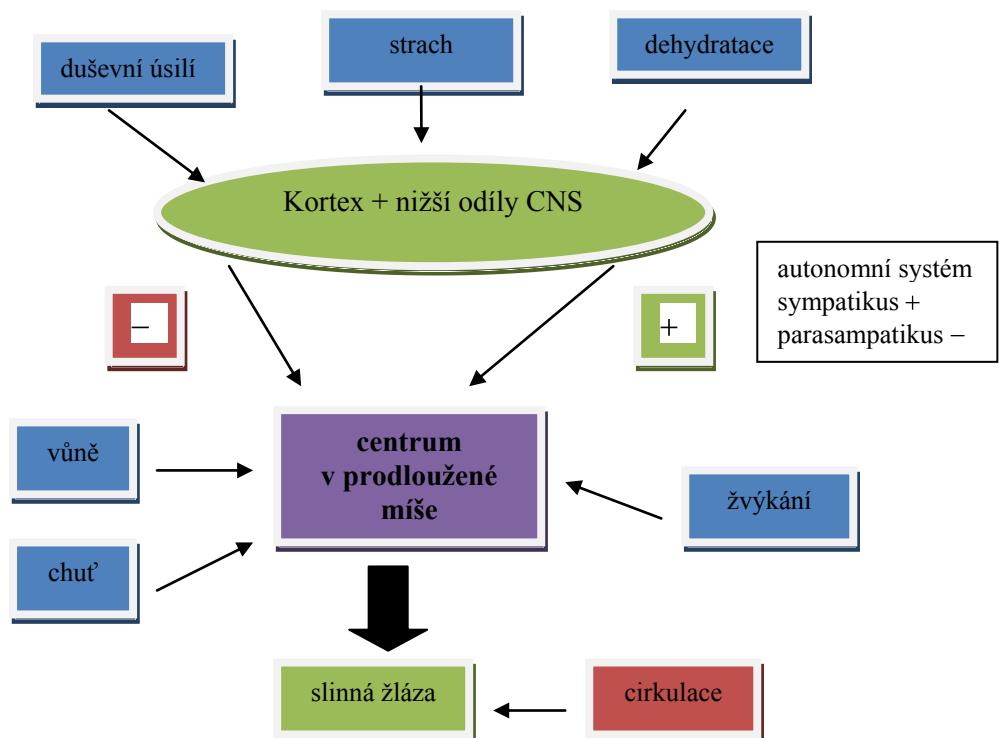
Velké slinné žlázy se skládají ze slinných lalůčků - acinů, které obsahují, dle typu žlázy, serózní, mucinózní, popřípadě smíšené buňky. Slinné žlázy jsou inervovány autonomním nervovým systémem, přičemž regulačním centrem je nucleus salivatoris v prodloužené míše s kontrolním centrem v hypotalamu (Obr. 3). Parasympatická vlákna zásobující podčelistní a podjazykovou slinnou žlázu vycházejí z n.intermedius a spolu s n.facialis přes chorda tympani se vstupují do žláz. Parasympatická vlákna pro příušní žlázu která pocházejí z nervus glossopharyngeus vstupují do žlázy cestou n. auriculotemporalis. Sympatická vlákna se dostávají do žláz spolu s cévami. Stimulací obou autonomních nervových soustav dochází k produkci sliny.

Složka		Slina (mM)	Plazma (mM)
Anorganická	Ca ²⁺	1 - 2	2,5
	Mg ²⁺	0,2 - 0,5	1,0
	Na ⁺	6 - 26	140
	K ⁺	14 - 32	4
	NH ₄ ⁺	1 - 7	0,03
	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	2 - 23	2
	Cl ⁻	17 - 29	103
	HCO ₃ ⁻	2 - 30	27
	F ⁻	0,0005 - 0,005	0,001
	SN ⁻	0,1 - 2,0	-
Organická	Urea	2 - 6	5
	Kyselina močová	0,2	3
	Aminokyseliny (volné)	1 - 2	2
	Volná glukóza	0,05	5
	Kyselina mléčná	0,1	1
	Mastné kyseliny (mg/l)	10	3000
Makromolekulární (mg/l)	Bílkoviny	1400 - 2000	70 000
	Glykoproteiny	110 - 300	1400
	Amyláza	380	-
	Lypáza	109	-
	Peroxidáza	3	-
	IgA	194	1300
	IgG	14	13 000
	IgM	2	1000
	Lipidy	20 - 30	5500

Tab.1
Provnání složení sliny a plazmy



Obr. 2.
Topografie velkých slinných žláz
(1. gl. parotis, 2 gl. submandibularis, 3 gl. sublingualis)



Obr. 3
Schéma stimulace produkce sliny

Slina je tvořena z 98 % vodou. Zbývající 2 % jejího objemu tvoří anorganické látky, jako jsou elektrolyty (Na, K, Ca, Mg, hydrogenuhličitany a fosforečnany), z dalších substancí zejména hlen tvořený především mukopolysacharidy a glykoproteiny, antiseptické látky (peroxid vodíku, IgA) a různé enzymy (α -amyláza, lysozomy, lingvální lipáza).

Průměrný denní objem produkce sliny je 500-1000 ml. Na celkovém objemu produkce se podílí submandibuální žláza přibližně 70 %, příušní žláza 25 % a sublingvální žláza asi 5%. Podíl drobných slinných žlázek na celkovém objemu sliny je zanedbatelný.

Slina má celou řadu funkcí: podílí se na hladkém trávení a přijímání potravy, zprostředkuje chuťové vjemy, spolupůsobí při reparaci měkkých tkání, udržování rovnováhy orální mikroflóry, zajištění stability prostředí ústní dutiny, remineralizaci skloviny a v neposlední řadě prostřednictvím slinných proteinů také imunitní a obranné pochody (Tab. 2). Nedostatek sliny (xerostomie) nemá jen negativní dopad na orální zdraví, ale i na zhoršení kvality života jako celku. Xerostomie může být navozena medikamentózně, jako vedlejší účinek léčby β – blokátory, sedativy a antipsychotickou medikací. Další příčinou může být autoimunní onemocnění (Sjögrenův syndrom) – podrobnosti v kap. 1.1.2. Vlivem nedostatku sliny dochází k poruše mikrobiální rovnováhy ve prospěch některých patogenů, jako např. *Candidy albicans* a *Streptococcus mutans*.

Slina produkovaná sublingválními, submandibulárními a drobnými slizničními žlázami je velmi bohatá na mucinózní proteiny (MUC5B a MUC7) a obashuje jen malé množství amyláz. Naproti tomu slina příušní žlázy je bohatá na amylázu (20 %), prolinové proteiny (60 %) a fosfoproteiny – statherin (7 %), ale bez zastoupení mucinózních proteinů.

Statheriny (název odvozen z řeckého statheropio- stabilizovat) jako inhibitory proteáz mají hlavní roli v udržení rovnováhy při tvorbě, eventuálně odbourávání skloviny a jejich minerálů.

Prolinové proteiny mají podobnou strukturu jako statheriny a mají také stejnou obrannou funkci. Jsou hlavní součástí sklovinné pelikuly (enamel pellicle), která jako 0,1 μ m silná vrstva brání narušování zubní skloviny bakteriemi a zabraňuje

demineralizaci skloviny. Další složkou této vrstvy jsou kromě prolinových proteinů také sérové proteiny, slinné proteiny a glukany.

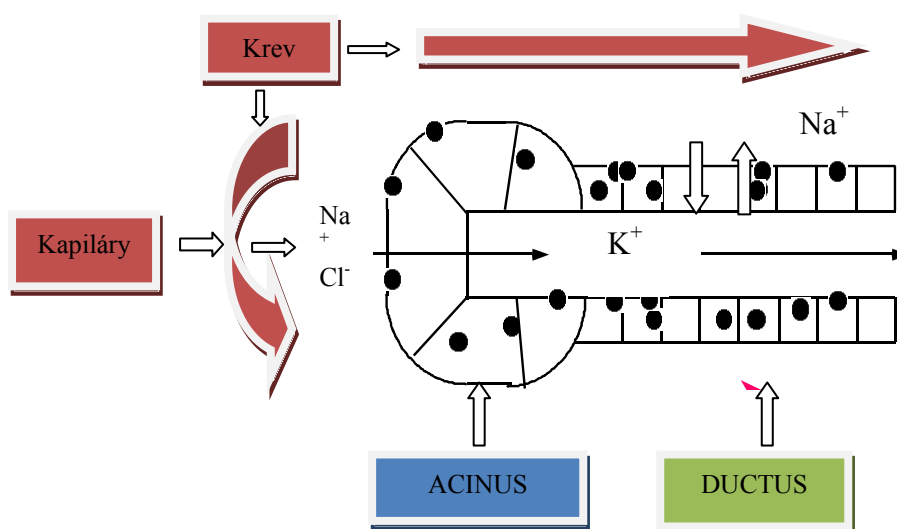
Hlavní úlohou mucinu MUC5B je ochrana tvrdých a měkkých tkání tvorbou gelové molekulární vrstvy před mikrobakteriálními, chemickými a fyzikálními vlivy. Tato vrstva snižuje abrazi zubů a chrání je před dalším mechanickým poškozením. Substituce tohoto proteinu je jen částečně možná karboxymethylcelulózou, muciny ze zvířecí sliny a Xanthanem (polysacharid s vysokou molekulovou hmotností, který vzniká fermentací sacharidů vyvolanou bakterií *Xanthomonas campestris*). MUC5B se váže pouze na omezené množství orálních bakterií, jako jsou např. *Helicobacter pylori*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Candida albicans* a v neposlední řadě na virus HIV-1. MUC7 mucin se díky své nízké molekulární hmotnosti snadno váže na bakterie a viry (HIV) a tím zajišťuje orální bakteriální clearance. Na druhé straně jako hlavní složka pelikuly podporuje adhezi bakterií, zejména *Streptococcus mutans*, na povrch zubů a tím podporuje jejich kolonizaci v dutině ústní. Bez zastoupení mucinů ve slině sliznice ztrácí mechanickou odolnost, je náchylnější k různým zánětlivým a infekčním komplikacím. Z antibakteriálních látek obsažených ve slině je třeba zmínit IgA, který je schopen aglutinací vázat bakterie. IgA vzniká v lymfatických buňkách sliznice, tonsil a v Peyerských plátech souhrnně nazývaných jako – „mucosa associated lymphoid tissue“.

Důležitou roli hraje také laktoferin, který vazbou železitých iontů jako nezbytné součásti výživy bakterií znemožňuje jejich využití bakteriemi a omezuje tak jejich množení. Naopak sialoperoxidáza je enzym, který katalyzuje reakci metabolického produktu bakterií- peroxidu vodíku se slinným thiokyanátem za vzniku pro bakterie toxických kyslíkových radikálů.

Slina dále obsahuje mnoho dalších proteinů jako histatiny, polypeptidy s antibakteriální a antifugální schopností, které jsou obsaženy výhradně ve slině. Lysozym je enzym, který se vyskytuje ve slinách, slzách, nosním hlenu, krevní plazmě, bílých krvinkách a mateřském mléce. Díky schopnosti narušovat bakteriální stěnu má silné antibakteriální účinky. Není zcela jasná úloha cystatinů, inhibitorů cystein-proteázy bakterií a destruovaných leukocytů, což může hrát významnou roli při onemocnění parodontu. V neposlední řadě je třeba zmínit slinnou Alfa-amylázu jako enzym štěpící cukry, tvořený ve slinných žlázách.

Ochranná	<i>Remineralizace skloviny</i>	<i>PRP, Statherin, Ca, Fosfáty</i>
	<i>Inhibice remineralizace skloviny</i>	<i>muciny</i>
	<i>Lubrikace sliznice</i>	<i>PRP, muciny</i>
	<i>Pufrovací aktivita</i>	<i>Bikarbonáty, Proteiny, Fosfáty</i>
Trávicí	<i>Štěpení látek</i>	<i>limáza, amyláza, protéáza</i>
	<i>Chuť</i>	<i>zinek</i>
	<i>Formování sousta</i>	<i>muciny</i>
Antimikrobiální	<i>Antivirová</i>	<i>muciny, Ig, cystatiny</i>
	<i>Antifugální</i>	<i>Ig, muciny, histatiny</i>
	<i>Antibakteriální</i>	<i>muciny, histatiny, cystatiny</i>
		<i>lactoferin, Agglutinin, lysozym</i>
		<i>Lactoperoxidáza</i>

Tab. č. 2
Složení a funkce sliny



Obr. č. 4.
Mechanismus transportu iontů ze séra do slinných kanáleků.

2.2. Slina jako diagnostické medium

Myšlenka využití sliny v diagnostice se objevila ve druhé polovině 20. století. Výhodou je zejména jednoduchá, neinvazivní technika odběru v porovnání s periferní krví.

Podobně jako analýza periferní krve, má také rozbor sliny dva hlavní cíle: diagnostikovat příslušné onemocnění a sledovat jeho další vývoj v závislosti na terapii.

Analogicky jako v krvi se i v orální tekutině se využívá k diagnostice a monitoringu onemocnění několika biomarkerů (tab. č. 3)

Biomarkery sliny/orální tekutiny	Možnosti jejich využití
DNA	Standardní genotypizace Bakteriální infekce Diagnostika karcinomů hlavy a krku Forenzní hledisko
RNA	Virová/bakteriální indentifikace Karcinomy hlavy a krku
Proteiny	Diagnostika periodontitis Diagnostika karcinomů hlavy a krku Detekce zubního kazu
Muciny/glykoproteiny	Diagnostika karcinomů hlavy a krku Detekce zubního kazu
Immunoglobuliny	Diagnostika virů (HIV, hepatitis B a C)
Metabolity	Diagnostika periodontitis
Drogy a jejich metabolity	Monitorace abusu drog Detekce drogy v těle
Viry, Bakterie	Epstein-Barr virus reaktivace (mononukleóza)
Buněčný materiál	Diagnostika karcinomů hlavy a krku

Tab č. 3
Slinné biomarkery a potencionální možnosti jejich využití.

Slina v diagnostice autoimunitních onemocnění

Autoimunitní onemocnění představují různorodou skupinu s odhadovanou prevalencí mezi 5 % - 8 % (USA). Obecně se jedná o poruchy autoimunitního systému, které vedou k poškození vlastních orgánů postiženého jedince. Velkou část těchto poruch je obtížné diagnostikovat a jejich podstata není zcela jasná.

Jednou z nejčastějších onemocnění autoimunitního typu je Sjögrenův syndrom, který postihuje zejména ženy ve 4. – 5. deceniu života. Jedná se o chronické onemocnění, v jehož patogenezi hrají významnou roli viry typu HTLV-1, postihující slzné, slinné a jiné exokrinní žlázy. Důsledkem je snížená sekrece těchto žláz. Nová klasifikace rozlišuje dvě formy Sjögrenova syndromu, primární a sekundární³. Primární Sjögrenův syndrom (postižení slzných a slinných žláz) není doprovázen onemocněním pojiva jako je tomu u sekundárního typu (revmatoidní artritida, SLE, polyomyositis, primární biliární cirhóza, thyreoditida či vaskulitidami). Kromě očního postižení (keratoconjunctivitis) a kloubů (polyarthritis) se setkáváme s orálními symptomy, které spočívají v nedostatečné salivaci znesnadňující polykání a výslovnost. Hyposialie má i negativní dopad na vzrůstající četnost zubního kazu. Nejvýrazněji se hyposialie projeví na sliznici jazyka, kde dochází k atrofii papil. Orální sliznice dutiny ústní je suchá, zarudlé barvy. V celkovém obrazu nemocných dominují zvětšené příušní žlázy, subfebrilie, zvýšená sedimentace erytrocytů, v krevním obraze anémie a lymfocytóza. Vzhledem ke zvýšené prevalenci maligního B – MALT (mucosa – associated lymphoid tissue)lymfomu je Sjögrenův syndrom považován za prekancerózu^{4,5}.

Klasifikační kritéria pro diagnostiku Sjögrenova syndromu byla založena v letech 1989 – 1996 Evropskou studijní komisí pro Sjögrenův syndrom (ESGCS)⁶. Diagnostika Sjögrenova syndromu se dnes opírá o klinickou symptomatologii a histopatologické vyšetření doplněné sialometrií (Škachovým testem) ke změření produkce slinné sekrece. Diagnostická excize se provádí v lokální anestezii, nejčastěji ze sliznice dolního rtu, obsahující drobné slinné žlázy. V histopatologickém obraze je patrný zánětlivý infiltrát s přítomností T a B lymfocytů, celkovou atrofií acinárních buněk a dilatací tubulů s celkovou fibrózou tkáně⁷.

Diagnostika Sjögrenova syndromu je díky jeho různorodé symptomatologii a nedostatku sensitivních a specifických laboratorních markerů problematická.

V minulosti byla snaha využít v diagnostice Sjögrenova syndromu sérových markerů (sérové cytokiny – IL-6, TNF-alfa, BAFF, lysozomální enzymy, řada protilátek). Žádný z nich však neprokázal dostatečnou specifitu. Podobné biomarkery byly sledovány ve slině, ale stejně jako v krvi nebyly dostatečně průkazné či specifické.

V poslední době se v diagnostice Sjögrenova syndromu začaly uplatňovat moderní metody analýzy proteinů. Studie Ryua a dalších⁸ je založena na analýze slinných proteinů pomocí proteinových čipů – /surface-enhanced laser desorption

ionization-time-of-flight-mass spectrometry/ (SELDI – TOF – MS). Tímto způsobem se u Sjögrenova syndromu podařilo prokázat zvýšenou hladinu laktoferinu, beta 2 mikroglobulinu, lysozymu C, cystacynu C a snížení slinné amylázy a karbonické anhydrázy. Pro získání větší validity této metody je zapotřebí dalších studií.

Moser a spol.⁸ pomocí genové analýzy periferní krve zjistili rozdíly v metabolismu interferonu I, která se vyskytuje nejen u Sjögrenova syndromu, ale také u systémového lupus erythematoses, dermatomyozitidy a psoriázy.

Využití sliny v onkologické diagnostice

Maligní nádory dutiny ústní

V globálním měřítku patří orofaryngeální karcinomy mezi 10 nejčastějších malignit. Ročně je na světě hlášeno až 500 000 nových případů onemocnění. Navzdory lepší a agresivnější terapii je 5ti letého přežití dosaženo jen u 30 %-40 % nemocných. Tuto nízkou dobu přežití můžeme zdůvodnit pozdní diagnostikou, nedostatečnou odpovědí nádorů na chemo a radioterapii a také nedostatkem biomarkerů vhodných k diagnostice a postterapeutickému sledování nádoru. Základní a spolehlivou metodou v diagnostice orofaciálních nádorů stále zůstává biopsie následovaná histopatologickým vyšetřením. Jedna z možností jak rozšířit diagnostické možnosti primárních tumorů a jejich recidiv je sledování hladiny vybraných biomarkerů s dostatečnou senzitivitou a specifitou..

Orální tekutina představuje diagnostické medium se snadným a minimálně invazivním odběrem materiálu. Bylo publikováno mnoho prací zaměřených na průkaz DNA biomarkerů v diagnostice spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. Mutace tumor supresorového genu p53 je známa u celé řady malignit. U maligních nádorů hlavy a krku dosahují jeho mutace až 50 %. Tento fakt dokazují některé studie, zaměřeny na analýzu mutace onkogenu p53 metodou (PCR)⁹. Metodou ELISA byly u 13% pacientů (3/23) léčených se spinocelulárním karcinomem dutiny ústní, detekovány protilátky p53¹⁰. Nicméně žádný z DNA markerů zatím nenašel pevné místo v diagnostice spinocelulárního karcinomu dutiny ústní.

Další práce byly zaměřeny na průkaz lidského papilomaviru (HPV 16 DNA) ve slině, jako jednoho z mnoha etiologických činitelů. Incidence HPV pozitivity u pacientů léčených pro karcinomy dutiny ústní je odhadována na více než 45 %¹¹. Nicméně, jenom u 57 % z těchto nemocných je možno z výplachů dutiny ústní detekovat podtyp HPV – 16 se sensitivitou 32,6 %. Také další studie poukazují na nízkou sensitivitu a specifitu, které limitují využití této metody¹².

V poslední době se objevují názory, poukazující na význam průkazu proteinových markerů pro diagnostiku spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. Například hladina karcinom embryonálního antigenu (CEA) ve slině u malignit dutiny ústní je zvýšena, zatímco hladina gastrointestinálního karcinomového antigenu (GICA) je snížena¹³. Hladina lidského alfa defensin-1 (HNP-1), jako proteinového markeru, se u pacientů po chirurgickém odstranění karcinomu snížila. U zdravých pacientů tento proteinový marker nebyl diagnostikován¹⁴.

V laboratořích University v Los Angeles (UCLA) bylo diagnostikováno více než 309 slinných proteinů běžně se vyskytujících u zdravého jedince. Z těchto zjištěných proteinů se v diagnostice spinocelulárního karcinomu využívá IL 8 a thioredoxin. Wong a kolektiv¹⁵ prezentují zvýšené hladiny IL8 a mRNA u spinocelulárního karcinomu dutiny ústní, které jsou mnohonásobně vyšší než u prostého zánětu (gingivitis, parodontitis), což podle autorů zajišťuje dostatečnou specifitu markerů.

Orální tekutina se využívá také v diagnostice dalších malignit. Karcinom prsu představoval jeden z prvních zhoubných nádorů, který byl detekován prostřednictvím genetických, proteinových biomarkerů. Streckfus¹⁶ upozornil ve svých pracích na zvýšenou hladinu CA15-3 a receptoru epidermálně růstového faktoru (EGF) u pacientek s karcinomy prsu. Di-Xia, Schwartz a Fan-Qin¹⁷ prokázali zvýšenou hladinu CA 125 a glykoproteinového komplexu ve slině u pacientek s ovariálními karcinomy v porovnání s kontrolní skupinou zdravých pacientek.

Hematoonkologie

V posledních letech byly publikovány práce změřené na detekci neutrofilů v orální tekutině u hematoonkologických pacientů po transplantacích kostní dřeně. Wright a další¹⁸ se zaměřili na stanovení hladiny neutrofilů v orální tekutině jako možného indikátoru úspěšnosti připojení štěpu po transplantaci kostní dřeně. Neutrofilů detekovali ve slině o 2-3 dny dříve než v periferní krvi. U zdravých pacientů prokázali

kolísavou hladinu neutrofilů ve slině během dne. Gorgun a spol.¹⁹ potvrdili ve svých pracích závěry Wrighta a navíc prokázali, že hladina neutrofilů ve slině klesá myeloablativní léčby k nulovým hodnotám o den později než v krvi a naopak stoupá (o 1 – 2 dny) dříve než hladina neutrofilů v krvi. Cheretakise²⁰ a spol. stanovili hladinu neutrofilů, indikující příhojení štěpu po transplantaci kostní dřeně na hodnotu $0,25 \times 10^4 / \text{ml}$. V souboru 29 pacientů prokázali vzestup hladiny neutrofilů ve slině dříve než v periferní krvi. Zaměřili se také na stanovení stupně závažnosti orální mukositivity po myeloablativní chemoterapii a prokázali její zlepšení poté, co se neutrofilů ve slině znovu objevily. Tím nepřímo upozornili na význam neutrofilů v procesu hojení slizničních lézí. Přítomnost neutrofilů ve slině považují za důkaz „nasycení“ tkáně neutrofilů a na tomto základě vyslovují hypotézu, že časový interval příhojení štěpu kostní dřeně je přímo úměrný saturaci tkáně neutrofilů a daný jedinec má menší náchylnost k infekčním komplikacím²⁰. Lieschke a spol. ve své práci poukazují na strmý vzestup neutrofilů po podání růstových faktorů (G-CSF) nejen v krvi, ale také ve slině, což opět dokazuje jejich vzájemnou souvislost²¹.

Slina v diagnostice kardiovaskulárních onemocnění.

Slinnou amylázu jako jeden z proteinových biomarkerů lze detekovat chromatograficky nebo s využitím imunoanalýzy. Alfa amyláza zastává mezi těmito biomarkery jedinečnou roli, neboť je to enzym, který se skládá z 13 glykozylovaných hydroláz.

V kontrastu s mnoha sloučeninami přítomnými v orální tekutině, slinná amyláza není do orální tekutiny aktivně transportována či pasivně difundována z krve. Tento enzym je tvořen přímo ve slinných žlázách. Hladina slinné amylázy nekoreluje s hladinou systémové amylázy v krvi či v trávicím systému. Slinná amyláza není zastoupena ve slině od narození a její přítomnost je vázaná na příjem solidní potravy kojence. Touto absencí slinné amylázy u kojence do cca 7 měsíců věku je zajištěn příjem protilátek z mateřského mléka, na které by mohly mít amylázy jako makromolekuly s imunogenetickým potenciálem destrukční vliv.

Hlavní úlohou slinné alfa amylázy je podobně jako amylázy pankreatické štěpení cukrů. Slinná alfa amyláza má také antibakteriální působení s kladným dopadem na orální zdraví. Je prokázána souvislost mezi zvýšenou aktivitou slinné amylázy a snížením četnosti zubního kazu, onemocněním parodontu a hladinou

bakterií ve slině. Studie z poslední doby dokládají i zvýšení aktivity slinné amylázy vlivem stresu u adolescentů, u kterých bylo zjištěno zvýšení hladiny o 145 % oproti průměrným hodnotám²². Několik dalších studií potvrdilo zvýšení tohoto enzymu při kardiovaskulárních chorobách. Studie Chattertona a spol.²³ doložila vztah mezi zvýšením hladiny alfa amylázy a srdeční frekvencí, která se zvyšuje stresem. Dále byla také doložena pozitivní závislost mezi aktivitou sympatiku a hladinou alfa amylázy²⁴. Velmi důležitá je také závislost mezi zvýšením alfa amylázy a zkrácením preejekční periody, neboť tato hodnota dovoluje velmi dobře posoudit aktivitu sympatiku v organismu.

Význam sliny pro diagnostiku medikamentů a návykových látek

Diagnostika drog či léků ze sliny/orální tekutiny se v poslední době stala velmi rozšířila. Dříve byla pro tuto diagnostiku využívána moč, která je nyní stále více nahrazována diagnostikou z orální tekutiny.

Slinné žlázy, které tvoří slinu jako hlavní součást orální tekutiny, jsou bohatě prokrveny a proto dochází ke snadnému přechodu drogy či léčiva z krve do sliny. Během několika minut po parenterálním podání tak může být látka v orální tekutině zjištěna. Vzhledem ke své aciditě se některé drogy jako např. amfetamin a kokain objevují ve slině dříve než v plazmě. Obecně lze říci, že hladina drog, léčiv nebo jejich metabolitů ve slině přetrvává několik hodin až dnů po jejich podání.

Amfetamin

Amfetamin je sympatomimetický amin s centrálně stimulující aktivitou. Amfetamin a jeho metabolity jsou vylučovány močí. Množství vyloučeného amfetaminu však závisí na pH moči. Pokud je pH kyselé, je močí vyloučen asi ze 60 %, pokud však pH stoupne k alkalickým hodnotám, množství vyloučeného amfetaminu se rapidně snižuje až na 1-5 %²⁵. Amfetamin je v organismu produkován také jako produkt metabolické přeměny metamfetaminu.

Amfetamin se v orální tekutině objeví záhy po dosažení dané koncentrace v plazmě. Wan a další²⁶ provedli studii v níž měnili pH sliny podáním sody či chloridu amonného. I když pH sliny bylo relativně konstantní, hladina metabolitů amfetaminu bylo po podání chloridu amonného výrazně nižší.

Barbituráty

Barbituráty jsou léčiva se sedativním a hypnotickým účinkem, která jsou užívána pro léčbu křečových stavů a dále při úvodu do anestézie. Barbituráty můžeme dělit na krátkodobě působící- např. amobarbital a dlouhodobě působící (phenobarbital). Jedná se o návykové látky. Obecně jsou užívány perorálně. Klinické studie prokazující přítomnost barbiturátů v orální tekutině jsou poměrně málo početné s ohledem na návykovost těchto látek. Nejvyšší koncentrace amobarbitalu byla zjištěna v orální tekutině za 1 hodinu po perorálním podání, při čemž konstantní hladina přetrvávala 50 hodin²⁷.

Benzodiazepiny

Jedná se o rozsáhlou skupinu léčiv s hypnotickým, sedativním, antipsychotickým a antiepileptickým účinkem. Obecně se jedná o lipofilní molekuly s malou rozpustností ve vodě a rychlým vstřebáváním z GIT. Pro sledování jejich hladiny v orální tekutině byl vybrán diazepam, neboť je nejčastěji užívaným z této skupiny. Studie na toto téma jsou však také stejně jako u barbiturátů poměrně omezené. Bylo zjištěno, že hladina diazepamu, či spíše jeho metabolitu nordiazepamu se v plazmě i orální tekutině objeví asi za 45 minut.²⁸

Cannabis, marihuana

Jedná se psychoaktivní látku přirozeně se vyskytující v rostlině cannabis sativa. Po celém světě je používána jako tzv. měkká droga. Nejčastěji se marihuana dostává do těla kouřením. Proto i její hladina v orální tekutině je poměrně vysoká, což se přikládá právě kouření, než aktivnímu transportu slinou²⁹. V nedávných studiích bylo zjištěno, že je možná detekce marihuany z orální tekutiny i za cca 30 min. po pasivní inhalaci³⁰. Poslední studie však při přesnějším měření tuto teorii vyvrátily³¹.

Kokain

Kokain je lokální anestetikum a vazokonstriktor přítomný ve velkém množství v rostlině koka. Hlavním účinkem kokainu je krátkodobá stimulace následovaná euforií

vyžadující opakovanou dávku. V orální tekutině nacházíme kokain po všech formách podání, zejména však po kouření, či intranasální aplikaci. Hladina ve slině přetrvává cca 1 hodinu podání, poté však rychle klesá, podobně jako v krvi³².

Nikotin

Nikotin je alkaloid obsažený především v tabákových výrobcích. Nikotin je v organismu metabolizován na kotinin a 3-hydroxykotinin. Tyto dva metabolity se používají především při sledování jejich hladiny v orální tekutině ke zjištění intenzity pasivního kouření³³. Tato metoda se využívá například u těhotných žen.

Heroin

Heroin je acetylovaný derivát morfinu, připravovaný z opia, aplikovaný nejčastěji intravenózně. Jeho vysoká lipofilita umožňuje rychlou distribuci do centrálního nervového systému s následnou euforií³⁴.

Jeho hladina v orální tekutině je srovnatelná s hodnotami v plazmě, s maximem asi za 2 minuty po podání. Při kouření je jeho hladina v orální tekutině vyšší, po 30-60 minutách však klesá k hodnotám v periferní krvi³⁵.

Morfin

Morfin stejně jako ostatní opioidy působí přes opioidní receptory v mozku. Vede k dosažení analgezie a změn nálad, při dlouhodobém podávání vzniká závislost. Po parenterálním podání je možno morfin v orální tekutině rychle detekovat. Cone ve své studii popsál pouze 45 minutové zpoždění oproti plazmě po intramuskulární aplikaci³⁷. Ačkoliv je morfin rychle metabolizován konjugací, ve slině byl detekován pouze volný morfin. Morfin lze ve slině stanovit také po intravenózní aplikaci či kouření heroínu a po požití makových semen^{38,39}.

Kodein

Kodein je lék potlačující bolest a kašel, který je metabolizován oxidací na morfin³⁶. Nejčastěji se podává perorálně, často v kombinaci s jinými léčivými. Dávka 60 -

120 mg kodeinu je v orální tekutině detekovatelná za 1 hodinu, s maximální koncentrací za 1,6-1,7 hodin⁴⁰. Koncentrace kodeinu je v orální tekutině 3-4x vyšší než v plazmě⁴⁰.

Infekční onemocnění

Celosvětově nedošlo v posledních dvaceti letech k nárůstu incidence infekčních onemocnění. Je to důsledek rozsáhlého výzkumu, vývoje nových očkovacích látek, léků a antibiotik. Jestli se prostředky používané v západním světě rozšíří do rozvojových zemí, je zde předpoklad, že četnost infekčních onemocnění ještě více poklesne. Nyní je hlavním cílem výzkumu zaměřit se kromě multirezistentních bakterií jako jsou MRSA, také na virové infekce, jako je HIV nebo HPV.

Bakteriální infekce

V ústní dutině je přítomno přes 500 bakterií, většina z nich je nepatogenního charakteru a jsou v symbióze s ostatními bakteriemi. Pomocí různých molekulárních metod a kultivací byla provedena izolace periodontálních a kariogenních bakterií z různých vzorků z dutiny ústní. Rutinně používané metody neumožňují detekci primárně patogenních bakterií, které způsobují onemocnění plic, horních a dolních dýchacích cest. Například pozitivita mycobacterium tuberculosis byla zjištěna v orální tekutině metodou PCR v 98%, ale pomocí rutinní kultivace to bylo jen v 17,3%⁴¹. Pouze když je toto infekční onemocnění v akutním stadiu a hladina bakterií je velmi vysoká, objeví se mycobakteria v dutině ústní ve větším množství a je tedy možný jejich průkaz s využitím kultivace.

Helicobacter pylori je považován za nejčastější příčinu vzniku peptického vředu a je v současnosti také za rizikový faktor karcinomu a lymfomu žaludku. Přenos bakterie se děje fekálně – orální cestou, ale existuje jen málo prací zaměřených na kultivaci této bakterie z orálních či fekálních vzorků⁴². Zlatým standardem kultivace je tak stále biopsie žaludeční sliznice s následnou kultivací. Detekce specifické DNA helicobactera pylori pomocí metody PCR ze vzorků slin u symptomatických pacientů umožňuje průkaz infekce v aktivním stadiu⁴³.

Metody detekce Mycobacterium tuberculosis a Helicobacter pylori ukazují, že i když životaschopná bakterie není přímo detekovatelná v orální tekutině, slina obsahuje

markery těchto patogenů. Kromě DNA byly prokázány také jiné markery, jako jsou sekvence RNA 16S⁴⁴. V diagnostice streptokokové pneumonie se využívá detekce pneumokokového polysacharidu C ve slině bez detekce nukleových kyselin.

Virové infekce

Průkaz viru lidské imunodeficiencie (HIV) je velice dobrým příkladem pro využití sliny v diagnostice infekčních onemocnění. Množství infikovaných pacientů stále stoupá. Vytvoření protilátek přímo proti virovým proteinům - epitopům spolu s vývojem technik schopným detekovat tyto proteiny velmi usnadnilo testování HIV infekce⁴⁵. Například při průkazu HIV metodou ELISA v kombinaci s Western blotem je slina v porovnání s krví a močí pro vyšší specifitu a sensitivitu mnohem výhodnější⁴⁶. Slina může být použita také k měření hladiny beta 2 mikroglobulinu a nebo hladiny receptorů tumor necrosis faktoru alfa a dává tak možnost sledovat aktivitu viru HIV či s AIDS souvisejících zánětlivých onemocnění⁴⁷.

Naopak některé studie prokazují na 2-3x nižší hladinu viru HIV ve slině než v krvi⁴⁸. Výsledky jsou proto stále nejednoznačné a často kontroverzní.⁴⁹. Vzhledem k tomu, že stále nebyla vyvinuta očkovací látka proti infekci HIV, detekce antivirových protilátek je důležitá pro identifikaci infikovaného pacienta, či rizika přenosu infekce. Současné studie jsou proto zaměřeny především na detekci protilátek a detekci genu p24⁵⁰.

Přímá detekce a identifikace přítomnosti virů ve slině metodou PCR se postupně stává standardní metodou. Detekce RNA virů jakou jsou horečka dengue, hepatitis C, či vir HIV je však složitější, neboť jednovláčková RNA je mnohem méně stabilní než dvouvláčková DNA. Technika odběru materiálu a správná metodika jsou klíčové pro validitu výsledků. Nejlépe je PCR využívána k diagnostice infekce virem HPV 8. Průkaz tohoto viru ve slině či nasální tekutině je využíván k důkazu non-sexuálního přenosu tohoto viru⁵¹. PCR je také využívána pro diagnostiku CMV a HPV 6,7 a 8 ve slině u pacientů s HIV⁵².

Nověji je PCR metoda užívána k diagnostice lymfotropních virů jako jsou EB virus, CMV a HPV 6,7 a 8⁵². Metoda je přínosem také pro diagnostiku lidské formy vztekliny.⁵³

V neposlední řadě je třeba zmínit průkaz slinného antigenu EB viru pomocí RIA (radioimmunoassay) metody využívaného v epidemiologických studiích u školních dětí

54

3. Bakteriální flóra dutiny ústní

Bakteriální flóra v dutině ústní má u každého jedince individuální složení. To znamená, že je zachován určitý konstantní poměr mezi jednotlivými druhy mikrobů. Intenzita růstu jednotlivých bakterií úzce souvisí s charakteristickým prostředím ústní dutiny daného jedince. Bylo zjištěno, že existence různých mikroorganismů je vázána na synergistické a antagonistické vztahy. Je ale důležité podotknout, že v těchto vztazích – vzájemných bakteriálních interakcích – hraje důležitou roli makroorganismus. Jedná tedy o interakce mezi bakteriemi samými a interakce bakterií s organismem. Bylo také zjištěno, že na stálost ústní bakteriální flóry má vliv chemicko-fyzikální stav prostředí dutiny ústní, a že při změně tohoto prostředí převládá určitý bakteriální druh. Kupříkladu pro konstantní poměr mezi stafylokoky a streptokoky je důležité stálé pH prostředí. Při kyselém pH převažují streptokoky, bakterie acidofilní a kvasinky. Naopak při pH zásaditého charakteru převažují nejprve stafylokoky, později *E.coli* a při ještě vyšším pH *Proteus mirabilis*.

V této souvislosti je třeba poznamenat, že za regulaci pH dutiny ústní je zodpovědná slina díky své pufrovací schopnosti.

Ve zdravé dutině ústní je velký počet grampozitivních mikrobů. Pouze v malém počtu se vyskytují bakterie acidofilní. Dosti často jsou přítomny aerobní spóry, zatímco *E.coli* nebo *Proteus* jsou zastoupeny jen v nepatrném množství (Tab. č. 4). Při některých onemocněních dutiny ústní se však tyto poměry mění. Přibývá-li zubního kazu, převažují bakterie acidofilní a přibývá tedy kvasinek. Při zánětlivých onemocněních sliznice – parodontitidách, gingivitidách a orálních mukozitidách - je mikrobiální flóra mnohotvárnější. V akutních fázích zánětu převládají koky, naproti tomu při přechodu do chronických stádií převládá flóra anaerobní (leptotrichy, fusiformní tyčky a bakterie šroubovitého tvaru - spirily). V parodontálních chobotech se vyskytují vždy anaerobní bakterie, bez ohledu na to, zda jsou patrné slizniční známky zánětu.

Význam bakteriální flóry ústní dutiny pro vznik zánětlivých procesů není vždy zcela jasný. Uváděné baktericidní vlastnosti sliny se uplatňují nejčastěji jen ve styku

s tkáněmi, které omývají a pro něž jsou přirozeným prostředím. Neplatí to tedy pro otevřenou zubní dřeň, čelistní kosti a prostředí čelistních dutin. Nelze proto spoléhat na tohoto činitele při poranění čelistních kostí a perforujících poraněních sliznice. V těchto případech může mikrobiální příměs sliny naopak působit jako infekční agens. Je tedy otázkou, zda osídlení bakteriemi při onemocnění ústní dutiny je výrazem jejich patogenního účinku. K manifestaci onemocnění dochází, pokud nějaká zevní nebo vnitřní noxa sníží rezistenci sliznice (při malnutrici, karenci vitamínů, oslabení organismu nemocí). Vlivem uvedených okolností může dojít ke změně prostředí, které tak umožní přemnožení patogenních mikrobů tzv. fakultativních patogenních druhů, jako jsou (streptokoky, fusobakterie, actinomyces israeli, c.albicans, virus herpes simplex), které pak mohou za těchto změněných podmínek navodit příslušné onemocnění sliznice dutiny ústní.

Grampositivní bakterie (G+)		Gramnegativní bakterie (G-)		
fakultativně anaerobní	anaerobní	fakultativně aerobní	aerobní	
Streptococcus <i>S. mutans</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. milleri</i> <i>S. mitis</i> Stomatococcus	Peptostreptococcus <i>P. micros</i>	Neisseria	Veillonella <i>V. parvula</i>	KOKY
Actinomyces <i>A. naeslundii</i> <i>A. viscosus</i> Lactobacilus Corynebacterium Rothia	Actinomyces <i>A. israeli</i> <i>A. odontoliticus</i> Eubacterium Propionibacterium	Actinobacillus <i>A. actinomycetemcomitans</i> Caphocytophaga Eikenella <i>E. corrodens</i> Haemophilus	Porphyromonas <i>P. gingivalis</i> Bacteroides <i>B. forsythus</i> Prevotella <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> Fusobacterium <i>F. nucleatum</i> Leptotrichia Campylobacter <i>C. rectum</i>	TYČKY
Další mikroorganismy				
Treponema <i>T. vincenti</i> <i>T. denticola</i>	Mycoplasma	Candida <i>C. albicans</i>	Trichomonas	

Tab. č. 4.
Přehled nejdůležitějších mikroorganismů s výskytem v dutině ústní

4. Sliznice dutiny ústní

4.1. Anatomie, histologie

Sliznice vystýlá celou vnitřní plochu dutiny ústní s výjimkou zubů. V přední části vytváří ve vestibulu dvě sagitální řasy a to frenulum labii superioris a frenulum labii inferioris. Sliznice, která pokrývá plochu alveolárních výběžků, intraalveolární septa, krčky zubů, se označuje jako dásně- gingiva. Nejproximálnější část gingivy vzhledem k zubu označujeme jako volnou gingivu, lokalizovanou v těsném okolí krčku. Část gingivy, která je pevně připojena k alveolárnímu výběžku, odlišující se světlejší barvou, se označuje jako gingiva připojená.

Stejný charakter jako připojená gingiva má i sliznice tvrdého patra, naléhající ve střední čáře na mediální šev (raphe palati), která končí za předními horními řezáky slizničním výběžkem nazývaným jako papila incisiva.

Na přední části tvrdého patra je patrné příčné zvrásnění, které nazýváme plicae palatinae transversae. Na spodině dutiny ústní, na jejím přechodu od alveolárního výběžku ke spodině jazyka, je zřetelná slizniční řasa, uzdička jazyka (frenulum linguae). Po obou stranách uzdičky je patrná drobná vyvýšenina (caruncula sublingualis).

Sliznice jazyka (mucosa linguae) je vyznačena papilami. Rozeznáváme papilae filiformes (nitkovité) podmiňující sametový vzhled jazyka, papilae fungiformes (houbovité) roztroušené mezi papilami nitkovitými, papilae lenticulares (čočkovité), které se vyskytují hlavně na okraji jazyka a papilae valatae (hrázené) probíhající rovnoběžně se sulcus terminalis v oblasti kořene jazyka. V neposlední řadě jsou to papilae foliatae (listovité) lokalizované v zadní části před hrázenými papilami.

Zvláštní postavení na rozhraní mezi kůží a sliznicí má retní červeň, která má klinicky vzhled spíše ústní sliznice, histologicky však charakter epidermis s rohověním, ovšem bez přítomnosti kožních adnex a vývodů slinných žláz.

Z topografického hlediska můžeme sliznici dutiny ústní rozdělit na několik oblastí. Rozeznáváme sliznici tvářovou (bukální), retní (labiální), dásňovou (alveolární), patrovou včetně uvuly a patrových oblouků a sliznici ústní spodiny a jazyka.

S ohledem na funkci rozdělujeme ústní sliznici do tří základních typů:

1. sliznice specializovaná –dorzum jazyka
2. sliznice „ funkční“ – mastikační (patro, připojená gingiva)
3. sliznice „ nefunkční“ (vystýlající) – ostatní části sliznice dutiny ústní

Sliznice dutiny ústní je tvořena epitelem vrstevnatým dlaždicovým, jehož vlastnosti se liší dle funkce, podle toho jaké je vystaven zátěži (liší absencí či přítomností rohové vrstvy na povrchu slizničního epitelu).

- a) epitel ortokeratinizující kryje tvrdé patro, alveolární sliznici a připojenou gingivu. Skládá se ze 4 vrstev: stratum basale, spinosum, granulosum a corneum. V podstatě se podobá epidermis kůže, je ale tenčí a není přítomno stratum lucidum.
- b) epitel parakeratinizující kryjící sliznici vestibulární, tvářovou, sliznici měkkého patra a podjazykové krajiny. Má pouze 2 vrstvy: stratum basale a stratum spinosum.

Mezi epitelovými buňkami – keratinocyty- jsou v basálních vrstvách slizničního epitelu zastoupeny další typy buněk jako melanocyty (tvoří a uchovávají pigment melanin), Langerhansovy a dendritické buňky (antigen prezentující buňky), které se účastní imunitních reakcí.

Buňky stratum basale nasedají na bazální membránu, jemnou vazivovou vrstvu, která tvoří rozhraní mezi epitelem a lamina propria mucosae. Bazální membrána je různě zvlněna dle výšky papil lamina propria a dle hloubky epiteliálních čepů. Vzájemným prolínáním epiteliální a vazivové části sliznice dává sliznici mechanickou odolnost. Lamina propria mucosae je tvořena řídkým kolagenním vazivem s elastickými vlákny, buňčnými elementy (fibroblasty, fibrocyty, histiocyty, heparinocyty), krevními a lymfatickými cévami a nervovými pleteněmi přecházející plynule pod slizniční vazivo. V podslizničním vazivu se nacházejí drobné slinné žlázy, serózní, mucinózní, či smíšené, které trvale produkují malé množství slin a zajišťují tak lubrikaci sliznice.

4.2 Slizniční imunita

Kontakt organismu s vnějším prostředím se odehrává především na povrchu sliznic a kůže. Zatímco kožní povrch (plocha 3m²) je mechanicky dobře chráněn, mnohonásobně větší povrch sliznic (300m²) zažívacího, dýchacího, urogenitálního traktu a oční spojivky, většinou krytý vrstevnatým epitelem musí být chráněn dokonaleji. Je vybaven komplexem mechanických a fyzikálně-chemických prostředků mající za úkol degradaci a odstranění většiny cizorodých látek. Kromě toho jsou sliznice chráněny mohutně vyvinutým specializovaným imunitním systémem. Slizniční imunitní systém (v anglické literatuře označován jako „ MALT“ – mucosa associated lymphoid tissue) je tvořen u dospělého člověka z 80% imunologicky aktivními buňkami organismu. Většina těchto buněk je přítomna v tkáních gastrointestinálního traktu na střevní sliznici a představuje největší lymfatický orgán těla. Velké množství IgA, nejvíce produkované ve střevě a v dalších lymfatických tkáních dokazuje, že jsou nejvíce zastoupenou třídou imunoglobulinů a nejlépe dokumentují význam a efekt antigenních podmětů přítomných na sliznici.

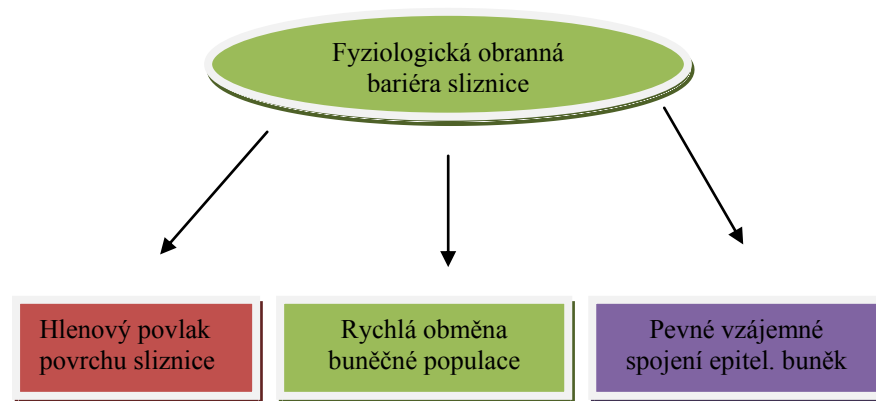
Infekční agens vstupuje do organismu většinou slizniční cestou (až v 90%) a značná část infekčních chorob je proto doprovázena jejich slizniční manifestací.

Slizniční imunitní systém zajišťuje tyto základní úkoly:

- bariérová funkce (brání pronikání infekčních a imunogenních složek přítomných na sliznicích do oběhu a tím do vnitřního prostředí organismu)
- antiinfekční struktura (obranu proti patogenním mikroorganismům)
- slizniční tolerance (snížená aktivita imunitního systému organismu vůči antigenům přítomných na sliznicích)
- imunoregulace (zajištění homeostázy na sliznicích)

Mechanickou (fyzikální) bariéru sliznic tvoří vrstva epitelových buněk pokrytá glykokalixem, který je tvořen komplexními glykoproteiny a muciny (Obr. 5). Vrstva epitelu je zpevněna těsnými spoji (tight junctions), které jsou umístěny v paracelulárním prostoru a tvoří propojenou síť. Bylo zjištěno, že tyto těsné spoje, které představují

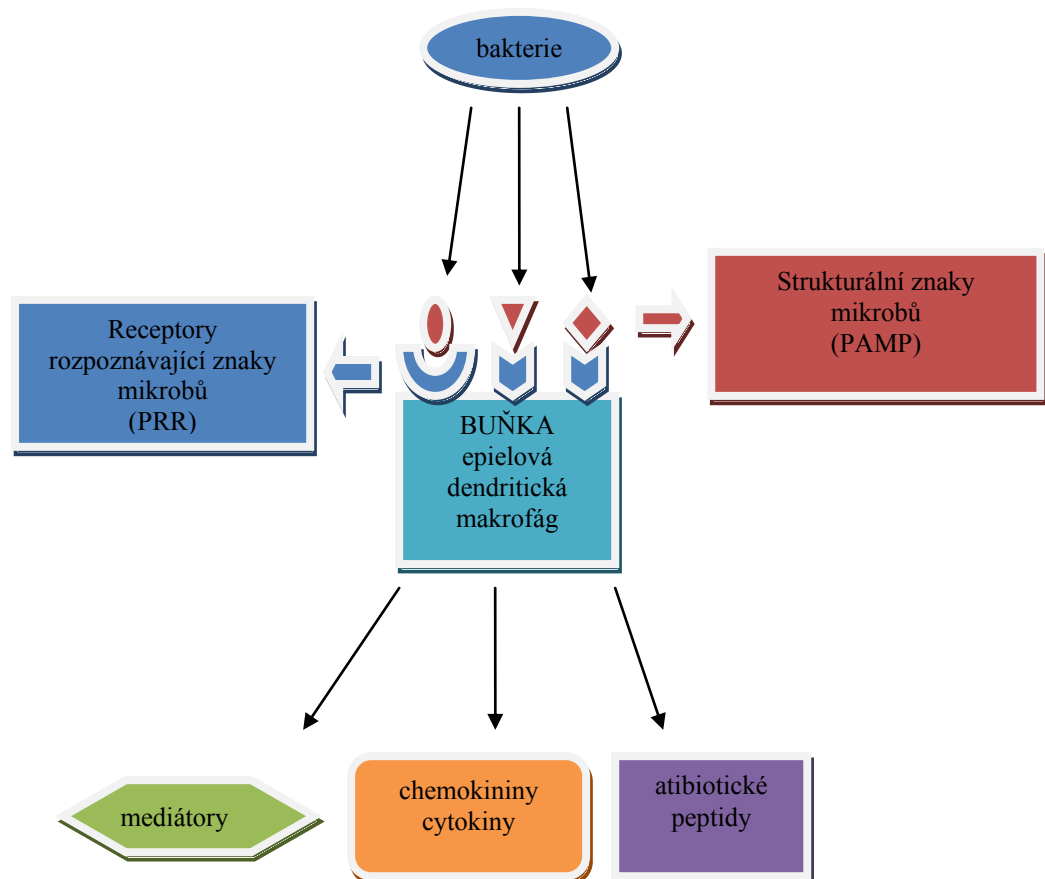
dynamická a přísně regulovaná místa, se otevírají a zavírají v odpovědi na různé signály. Těsné spoje jsou tvořeny několika proteiny, např. okludiny, kladiny, které jsou spojeny se složkami cytoskeletu a umožňují signalizaci do buňky. Kromě těsných spojů jsou v membráně epitelových buněk další adhezivní molekuly, které se účastní jak reakcí homotypických (interakce s buňkami stejného typu tj. epitelovými), tak reakcí heterotypických (epitelových s lymfatickými). Jednou z nejdůležitějších adhezivních molekul je e-cadherin. Bariérová funkce sliznic je značně ovlivňována nervovým systémem, cholinergními přenašeči (neurotransmitery), které například zvyšují pasáž makromolekul mezi těsnými spoji.



Obr. 5.
Fyziologická reparace sliznice

Základním mechanismem slizniční imunity je imunita přirozená, vrozená (nespecifická), představovaná procesy, které chrání hostitele před infekčním podmětem (Obr. 6). Charakteristickým rysem přirozené imunity je schopnost rozlišit strukturální znaky mikroorganismů (PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern), od antigenů tělu neškodných, především struktur vlastního organismu. Tyto strukturální znaky jsou rozpoznávány jak humorálními složkami tak především receptory na buňkách přirozené imunity (PRR – Pattern Recognition Receptors). Jako příklad těchto receptorů rozpoznávajících důležité složky mikroorganismů (lipopolysacharidy a proteoglykany) lokalizovaných na povrchu buněk přirozené imunity (např. makrofágy, dendritické buňky, T a B buňky, neutrofil, eozinofily, žírné buňky - mastocyty) lze uvést tzv.

„Toll-like recptory“ (TLR), které byly původně popsány u hmyzu. Po interakci dochází k aktivaci těchto buněk. Dalším typickým představitelem přirozené imunity jsou epitelové buňky. Ukázalo se, že kromě jejich bariérové funkce oddělující hostitele od prostředí mají i schopnost transportovat sekreční imunoglobuliny produkované plazmatickými buňkami přes cytoplazmu do dutiny ústní. Bylo prokázáno, že epitelové buňky reagují na pozánětlivé cytokiny syntézou proteinů vykazující imunologickou aktivitu. V poslední době převládá názor, že epitelové buňky po stimulaci produkují některé cytokiny – (TGF beta, IL – 1, IL – 6, IL – 8, IL – 10 a další), a navíc jsou schopny syntetizovat enzymy (cyklooxygenáza II a 12- lypoxigenáza), které účastní v syntéze mediátorů zánětu. Epitelové buňky hrají tedy významnou úlohu při interakci s mikroorganismy a při pronikání bakteriální infekce přes epitelie do organismu.



Obr.6.
Interakce bakterií a buněk přirozené imunity

4. Porušení slizniční bariéry

Obecné příčiny porušení slizniční bariéry můžeme rozdělit na vnitřní a zevní. Ze zevních příčin jsou to vlivy:

- mechanické, působící ve smyslu traumatizace sliznice (ostré hrany zubů, zubní kámen, špatně zhotovené protetické práce)
- termické, vyvolávající popálení (horké jídlo), nebo omrznutí sliznice (Cognoscin při zkoušce vitality zubů).
- radiační záření (radioterapie)
- chemické (poleptání kyselinami, zásadami)
- toxické (chemoterapie)

K vnitřním příčinám poškození slizniční bariéry patří:

- infekční agens lokálně působící na ústní sliznici (mikroby, viry, plísňe a kvasinky, paraziti). Působení těchto činitelů spadá převážně do rámce infekčních chorob a zánětu dutiny ústní.
- poruchy výživy a metabolismu (poruchy metabolismu vitamínů, bílkovin, železa, tuků).

Všechny příčiny poškození slizniční bariéry, které se na sliznici projevují jakoukoliv eflorescencí, kupříkladu i solitární aftou, označujeme z parodontologického hlediska jako stomatitis nebo orální mukositis. V praxi je zvykem označovat jako orální mukozitidu takové zánětlivé projevy, kde je slizničních eflorescencí více, anebo kde je zánětem postižen větší úsek sliznice, popřípadě i několik úseků současně.

V současné době v souvislosti s přibýváním malignit a využíváním radikální léčby (radioterapie, chemoterapie) přibývá orálních mukozitid vzniklých na tomto podkladě.

5.1. Porušení slizniční bariéry při transplantaci kostní dřeně

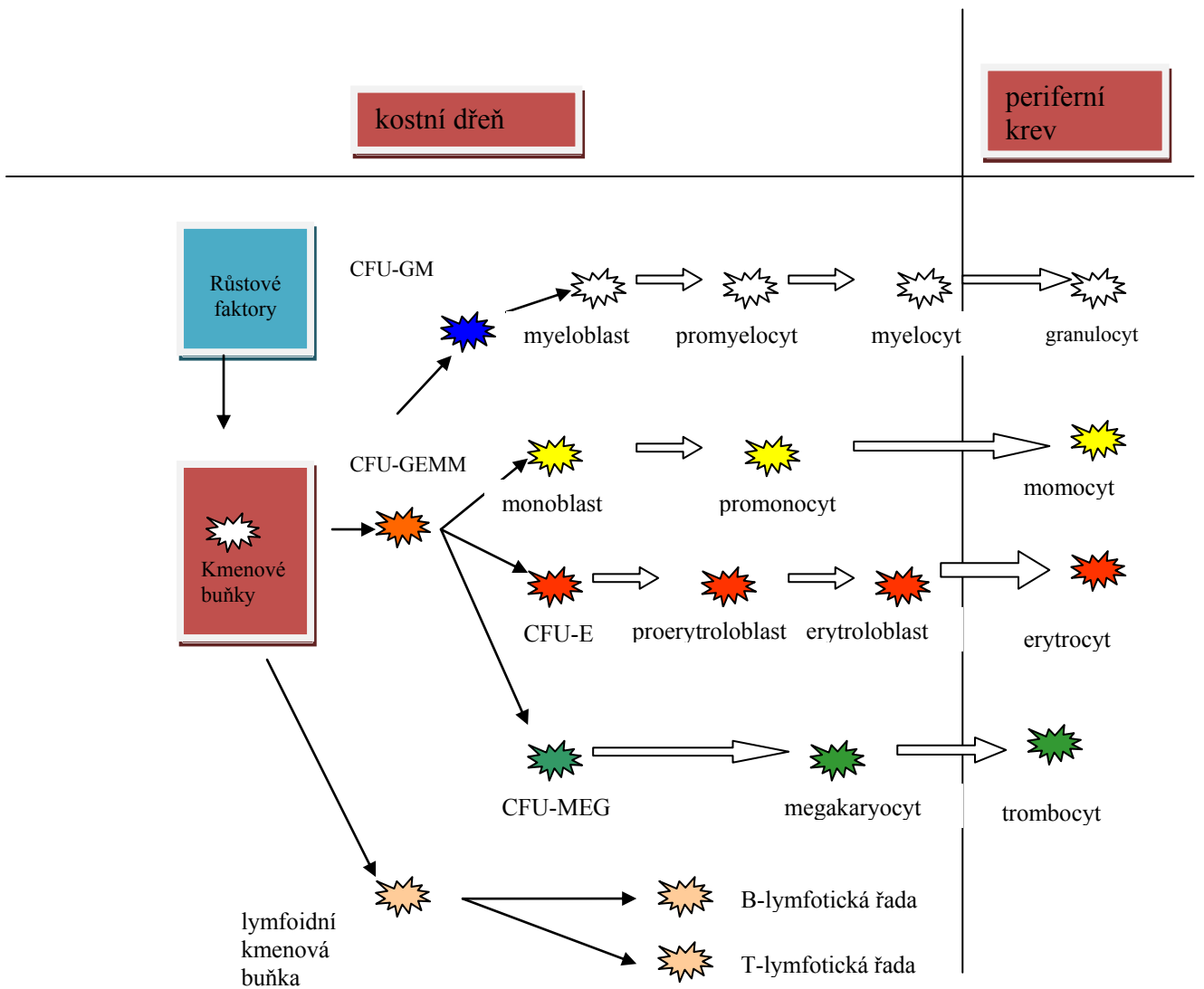
Vysoce dávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu periferních krvetvorných buněk je zavedenou standardní léčebnou metodou u řady hematologických malignit. Závažným problémem agresivní chemoterapie je vedle

systémových vedlejších účinků také výskyt těžkých orálních mukosítid, které vedou k omezení příjmu léků a potravy mají dopad na psychiku a celkový stav pacienta⁵⁵. V prevenci jejich vzniku je nezbytná intervence stomatologa provedená ještě před zahájením onkologické léčby (sanace všech potenciálních infekčních ložisek, odstranění devitalizovaných zubů, edukace nemocného o zásadách orální hygieny). Léčba rozvinuté orální mukosítidy v průběhu chemoterapie je většinou symptomatická (podrobněji kapitola 5.3.)

5.2. Transplantace kostní dřeně

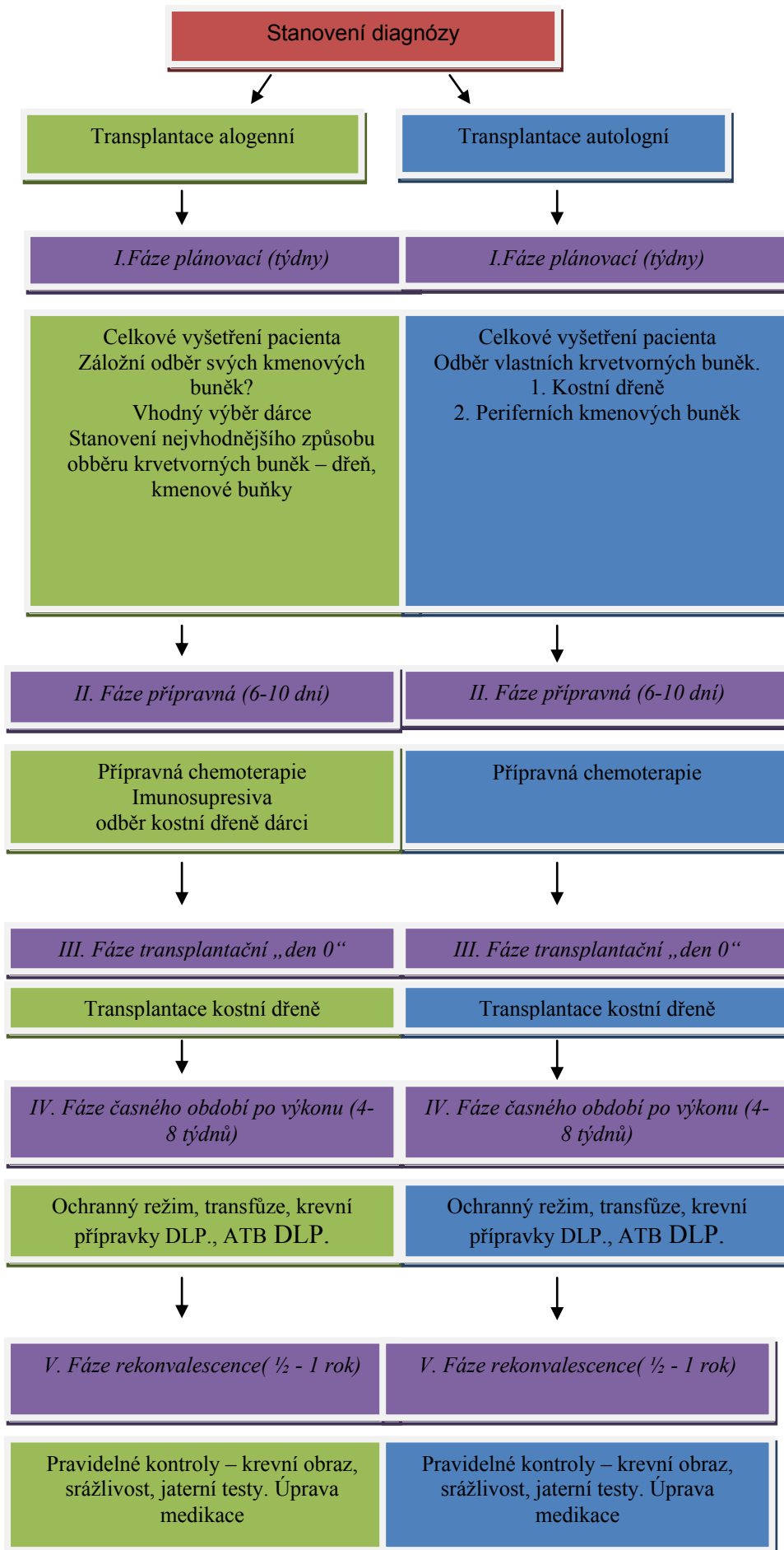
Transplantace kostní dřeně je dnes využívanou léčebnou metodou u leukémií, lymfomů imunodeficitních stavů a solidních nádorů. Historie této léčebné metody je relativně krátká. Počátkem 50. let používání syngenních štěpů kostní dřeně v léčbě imunodeficientních stavů u dětí určily směr této léčby⁵⁶. Velice důležitá byla identifikace tkáňových znaků, HLA antigenů (Human Leukocyte Antigens – antigeny lidských bílých krvinek) a rozpoznání histokompatibilního komplexu (MHC - major histocompatibility complex). Právě výzkum imunitního systému na molekulární úrovni zvýšil úspěšnost transplantace kostní dřeně.

Podstatou této léčebné metody je obnova krvetvorby transplantací kostní dřeně či periferních kmenových buněk po aplikaci chemoterapie, jejímž cílem je eliminace nádorového onemocnění (Obr. 7). Krvetvorné buňky získáváme od jiného zdravého člověka (transplantace alogenní) nebo od samotného pacienta (transplantace autologní). Přes zdánlivou vnější podobnost existuje mezi oběma způsoby transplantace řada zásadních rozdílů. Nejedná se jen o technické provedení, ale i o odlišný účinek na původní onemocnění, tak i zcela jiné působení na imunitní systém příjemce transplantátu. Proto oba způsoby transplantace mají své specifické indikace.



Obr.7.

Vývoj krvinek z pluripotentní kmenové buňky
 (CFU – cloni forming unit, GEMM – granulocyt/erythrocyt/megakaryocyt/makrofág –
 monocyt)



Obr. 8. Časový harmonogram transplantace kostní dřeň

5.2.1. Autologní transplantace kostní dřeně

Autologní transplantace kmenových buněk představují jakousi zajišťovací terapii po vysokodávkované chemoterapii (Obr. 8). Principem je konzervace vlastní kostní dřeně mimo organismus po dobu aplikace velmi toxických dávek chemoterapie, která má eliminovat nádorové onemocnění. Podmínkou je, aby pacient před výkonem měl vlastní kmenové buňky zdravé (Tab. 5). Sama autologní transplantace není schopna zabránit recidivě, pokud předchozí chemoterapie dostatečně neeliminovala nádorové onemocnění.

Indikace autologní transplantace v onkologii				
lymfomy	solidní tumory - seminomy karcinom <u>prsu + ovaria</u> sarkomy	akutní leukemie	chronické leukemie	myelomy
<i>bez infiltrace kostní dřeně</i>	<i>bez infiltrace kostní dřeně</i>	<i>pokud není k dispozici alogenní dárce</i>		<i>bez infiltrace kostní dřeně</i>

Tab. č.5
Indikace autologní transplantace

5.2.1.1. Provedení autologní transplantace

Odběr kostní dřeně

Odběr kostní dřeně pro transplantaci se provádí v období reparační z útlumu po předchozí přípravné chemoterapii. Sterilním punktátem vyšetříme bohatost dřeně. Vlastní odběr je prováděn v celkové anestezii aspirací kostní dřeně z lopaty kosti kyčelní za sledování počtu odebraných jaderných buněk. Celkové množství odebrané dřeňové krve je 1 – 1,5 l které přibližně představuje 2×10^8 /kg tělesné hmotnosti pacienta, což je minimální počet odebraných jaderných buněk. Další zpracování kostní dřeně spočívá v získání suspenze krvetvorných buněk z autologní plazmy. V kontejnerech s tekutým dusíkem je dřeň uložena až do doby transplantace. Vlastní transplantace je provedena po rozmražení vaku s kostní dření ve vodní lázni na 37°C, stejně jako u krevní transfúze.

Nyní se preferuje transplantace kmenových buněk z periferní krve, které se zde vyskytují v období reparační kostní dřeně po útlumu způsobené chemoterapií. Hlavní výhodou je menší zatížení pacienta, což nám dovoluje zařazovat i starší nemocné. Odběr periferních kmenových buněk je prováděn separátorem krevních elementů v období reparační kostní dřeně po tzv. mobilizační chemoterapii a po podání růstových faktorů. Odebrané periferní kmenové buňky jsou kryokonzervovány až do vlastní transplantace, která probíhá výše popsaným způsobem.

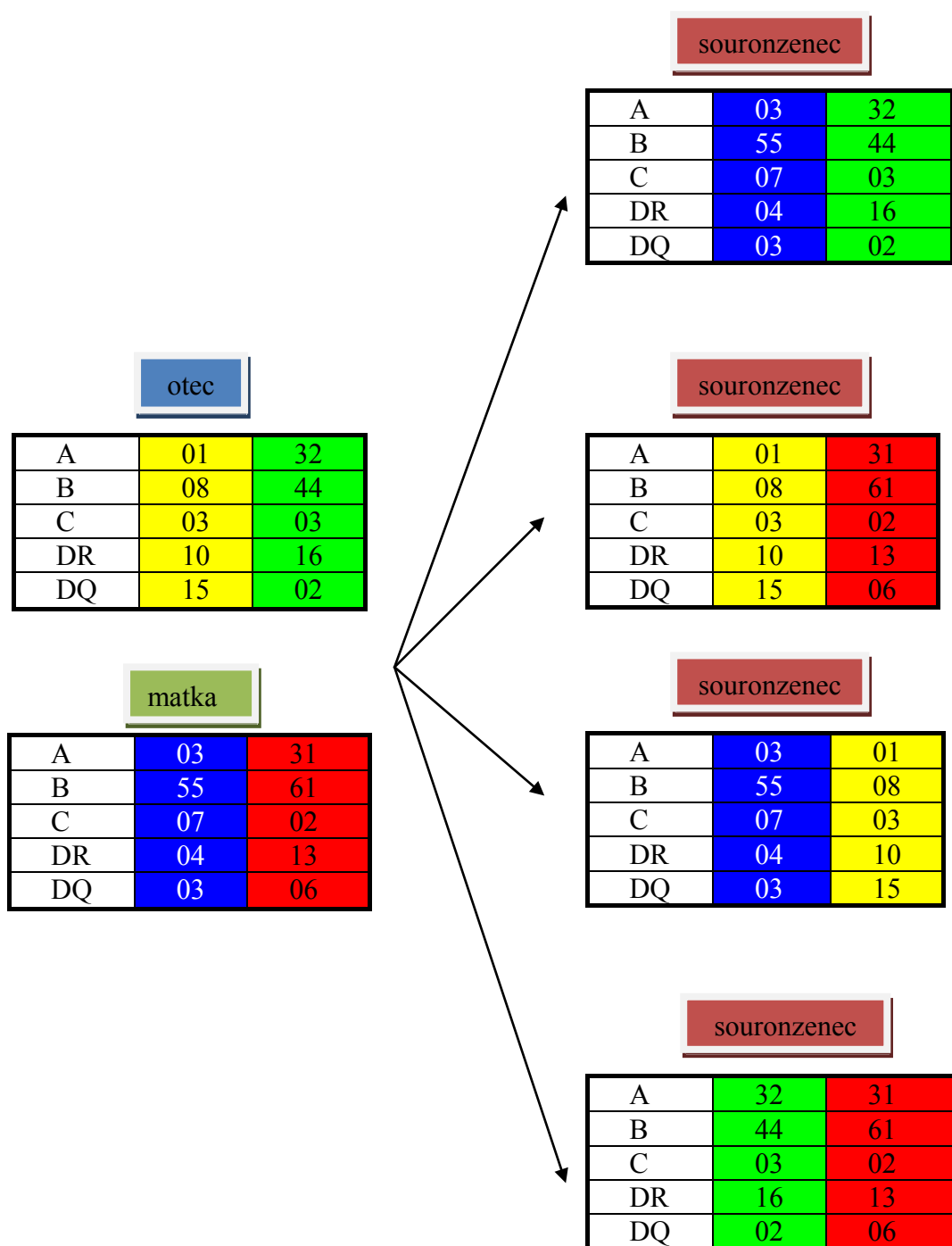
V prvním týdnu po transplantaci doznívají účinky přípravné chemoterapie. U některých pacientů se můžeme setkat s orální mukostidou, respektive mukositidou horní části trávicí trubice, která si často vyžádá silnou analgetickou terapii, častou i parenterální výživu. Další častou komplikací, spíše kosmetického charakteru je vypadávání vlasů, u žen často s negativní psychickou odezvou. U 5 – 10% pacientů je postižena jaterní tkáň tzv. venookluzivní nemoc jater, při které dochází k otoku kapilár s následnou nedostatečnou krevní perfuzí.

V období do přihojení kostní dřeně, tedy do vzestupu počtu leukocytů nad $1 \times 10^9/l$, nevytváří nemocný žádné vlastní krevní elementy z důsledkem možné anemie, neutropenie a trombocytopenie. Erytrocyty jsou nahrazovány erytrocytárními masy, trombocyty pomocí trombocytárních náplavů. Nahrazovat leukocyty je pro aloimunizaci nevýhodné, proto musíme nemocného uchránit od infekčních komplikací. U

autologních transplantací není striktně sterilní prostředí nutné, v zásadě stačí nemocného izolovat od ostatních pacientů s dodržováním aseptických postupů při ošetřování.

5.2.2. Alogenní transplantace kostní dřeně

Jedná se o transplantaci kostní dřeně od jiného jedince. Proti autologní transplantaci má daleko širší účinky. Kostní dřeň od zdravého dárce slouží nejen jako náhrada nemocné krvetvorby, ale může za určitých okolností navodit protinádorový efekt (Tab. 6). Ten souvisí s reakcí leukocytů dárce proti zhoubnému onemocnění příjemce (tzv. reakce štěpu proti leukémii či nádoru). Základní podmínkou alogenní transplantace je dostupnost vhodného dárce, jehož imunitní buňky mají určitou identitu tkáňových znaků (HLA antigenů) s kostní dření příjemce. Systém tkáňových znaků tvoří takzvaný tkáňový (HLA) typ (Obr. 9). Modelově si ho můžeme popsat jako soubor řady písmen „znaků“, které dohromady tvoří unikátní „popis těla“. Každé z písmen je zastoupeno ve dvou exemplářích (jeden dědíme od matky, druhý od otce). Od rodičů na potomky se příslušná polovina znaků předává v kompletní sadě (halotypu). Každý HLA znak má řadu variant, které se označují čísly např. (A 3,23, B 55, 61, C 3, 3, DR 4, 13, DG 3, 6). Z hlediska transplantace se v současné době považují za nejdůležitější takzvané HLA antigeny I. třídy A, B, C a antigeny II. třídy DR a DQ.



Obr.9.
Dědičnost tkáňových znaků
(kombinace halotypů)

Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GVHD)

GVHD vzniká pomnožením dárcovských T lymfocytů v organismu hostitele a jejich reakcí proti tkáním příjemce⁵⁷. Při GVHD jsou nejčastěji postižena střeva, játra, kůže a sliznice (Obr. 10). Rozlišujeme akutní a chronickou formu GVHD v závislosti na časovém průběhu. Reakce štěpu proti hostiteli může dosáhnout stadia neslučitelného se životem. Tomuto předcházíme právě vhodným výběrem dárce (nejčastěji pokrevný příbuzný) a podáváním imunosupresiv, v nynější době nejčastěji Cyklosporinu A. V počátcích alogenní transplantace byla preferována transplantace syngenní (mezi jednovaječnými dvojčaty), právě pro imunologickou identitu. Postupně bylo zaznamenáno více relapsů základního onemocnění. Důvodem je právě shoda genetického materiálu a tedy tendence k znovu výskytu malignity. Při transplantaci alogenní dřeně od identického sourozence je výskyt GVHD vyšší, ale také nižší výskyt relapsů základního onemocnění. Je zřejmé, že oba jevy spolu souvisí a do jisté míry je GVHD žádaná právě pro protinádorový efekt (reakce lymfocytů dárce proti „zbytkům“ příjemcova nádoru). Proto tento jev označujeme také jako reakci štěpu proti leukémii (graft versus leukemia GVL).



Obr.10.

Změny na patrové sliznici při orálních projevech GVHD.

Indikace alogenní transplantace kostní dřeně			
chronická myeloidní leukémie – <i>zde může alogenní transplantace znamenať až vyléčení choroby</i>	akutní myeloidní leukémie	akutní lymfoblastická leukémie	lymfomy, myelomy a solidní tumory - seminomy karcinom <u>prsu + ovaria</u> sarkomy
	<i>v první remisi</i>	<i>v druhé remisi</i>	<i>s infiltrací kostní dřeně</i>

Tab. č.6.

Indikace alogenní transplantace kostní dřeně

5.2.2.1. Provedení alogenní transplantace

Postup transplantace se liší časovým rozvrhem a nezbytnou imunosupresí pacienta. Příjemce je připraven kombinovanou myeloablativní chemoterapií, dříve doplněnou celotělovým ozářením, jejímž úkolem je ablace původní krvetvorné dřeně, za účelem odstranění malignity (leukemie). Novinkou posledních let je transplantace s redukovanou, nemyeloidní chemoterapií. Princip spočívá v neúplném odstranění pacientovi kostní dřeně a v následné imunitní přípravě pro uchycení kmenových buněk. Na konci chemoterapie se pacientovi začínají podávat imunosuprasiva (Cyklosporin A) k ovlivnění imunitní reaktivity. Dárcova dřeň se odebírá obdobným způsobem jako u alogenní transplantace, tedy klasickým odběrem z kosti nebo odběrem periferních kmenových buněk po mobilizaci pomocí růstových faktorů pro granulocyty G-CSF. Po jejím zpracování je ve stejný den podána příjemci jako intravenózní transfúze. Opatření v celém období od transplantace (den 0) až do přihojení kostní dřeně (20 – 30 dní) jsou podobná jako u autologní transplantace, jsou však prováděna s daleko větší intenzitou. Od doby přípravy přes vlastní transplantaci a do období rekonvalescence (1/2 – 1 rok)

jsou nemocnému podávány imunosupresiva s pravidelným sledováním jejich hladiny v krvi. Přihojení kostní dřeně přichází obvykle mezi 8. – 20. dnem po transplantaci. Závažnější komplikací u alogenní transplantace je selhání transplantátu, kterým rozumíme nedostatečnou produkci krvinek z tohoto štěpu. Primární selhání transplantátu je vzácné. Jeho příčinou je transplantace malého množství kmenových buněk, extrémní inkompatibilita HLA systému mezi dárcem a příjemcem. Sekundární selhání transplantátu je stav kdy vzestup krvinek byl již na požadovaných hodnotách, ale později začaly znovu klesat. Druhotné selhání dřeně je nečastěji působeno infekcí nebo imunitními mechanismy. Metodou volby je v primárním selhání použití záložní autologní transplantace či pokus o novou transplantaci od stejného či jiného dárce. Ve druhém případě většinou stačí odstranit vyvolávající příčinu (léčba infekce, úprava imunosupresivní léčby), podpořená růstovými faktory.

5.3. Orální mukozitída jako nežádoucí účinek chemoterapie a radioterapie

Onemocnění sliznice (mukositis) je častý vedlejší účinek chemoterapie a radioterapie používaných při léčbě maligních nádorů⁵⁸. Pro mukozitídu jsou typické léze různého rozsahu lokalizované na sliznici dutiny ústní, jícnu a celého gastrointestinálního traktu, které způsobují bolest, ztížené polykání, průjem a další poruchy činnosti závislé na postižené tkáni. Mukozitída dutiny ústní má negativní dopad na příjem potravy, výslovnost a polykací akt. Myelosuprese navozená přípravou chemoterapií zvyšuje riziko bakteriémie a sepse vyvolané mikroorganismy dutiny ústní.

5.3.1. Klinický obraz mukozitídy

Časnou klinickou známkou orální mukozitídy je erytém objevující se čtvrtý až pátý den po chemoterapii nebo po nakumulovaných dávkách radioterapie hlavy a krku (cca 10 Gy)^{55,58}. V tomto stádiu mukozitídy nemocní často poakazují na pálení sliznice a nemožnost konzumace kořeněných jídel. Za sedm až deset dnů po zahájení chemoterapie nebo radioterapie (ozařovací dávka cca 30 Gy) se na sliznici objeví bolestivé eroze, které si často vyžadují léčbu opiáty a v řadě případů komplikují přijímání potravy. V případě mukozitídy vyvolané chemoterapií jsou ložiska nejvíce viditelná na mastikační části buků sliznice a na hranách jazyka (Obr. 16). Tvrdé patro

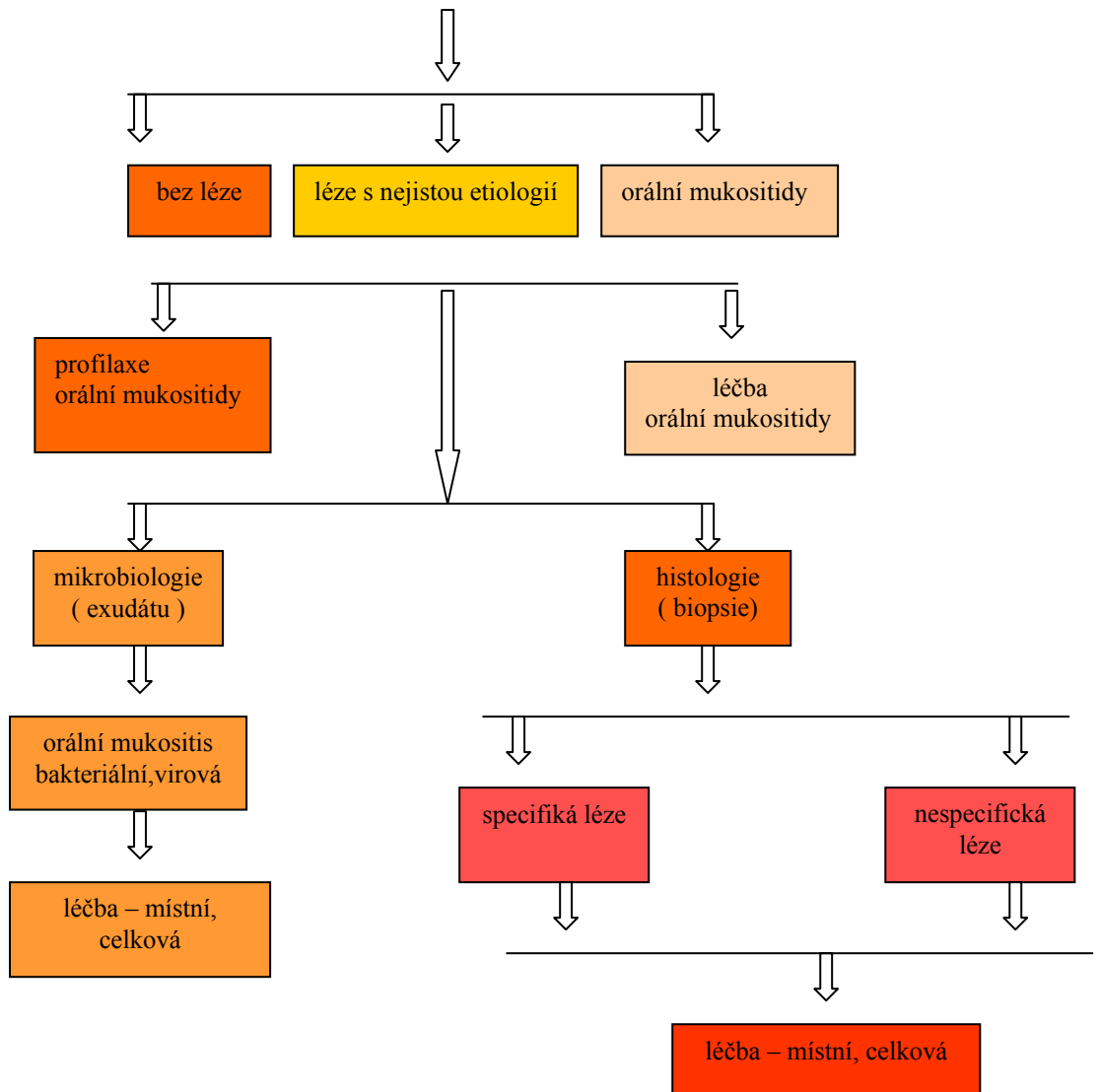
a gingiva jsou vůči mukozitídě vyvolané chemoterapií relativně odolné. V případě postradiační mukozitídy může být poškozena prakticky každá část sliznice, včetně tvrdého patra. Chemoterapií navozená mukozitída trvá přibližně týden a zpravidla se spontánně zhojí do tří týdnů po ukončení myeloablativní chemoterapie. Postradiační mukozitída trvá nejméně dva týdny; není výjimkou, že pacienti po radioterapii orofaciálních karcinomů, trpí těžkou mukozitídou pět až sedm týdnů. Chronická mukozitída po radioterapii se vyskytuje zřídka.

5.3.2. Diagnostika orální mukozitídy

Diagnostika orální mukozitídy je založena na standardním stomatologickém vyšetření, podrobné anamnéze a klinickém vyšetření dutiny ústní (Obr. 11). Zatímco chemoterapií navozená mukozitída se objevuje na mastikační části sliznice a jen zřídka postihuje hřbet jazyka, tvrdé patro nebo gingivu, radioterapií navozená mukozitída se vyskytuje i na mastikačních částech sliznice a tvrdém patře⁵⁹. V diferenciální diagnostice lze uvažovat o mukozitídách virové etiologie, případně reakci štěpu proti hostiteli (GVHD). Virové mukozitídy se klinicky odlišují ostrým ohraničením slizničních lézí, lokalizací na funkčních částech ústní sliznice, gingivy a hřbetu jazyka a také rozdílným klinickým průběhem. Bakteriologie, virologie a cytologie jsou často využívanými diagnostickými metodami.

Reakce štěpu proti hostiteli je omezena na pacienty po allogenní transplantaci kmenových buněk, která se rozvíjí se ve fázi rekonvalescence (za 21 dní po transplantaci). Projevuje se xerostomií s typickými orálními eflorescencemi, které mají často lichenoidní místy až ulcerativní charakter. Neutropenie navozená chemoterapií může být spojena až s nekrotickou gingivitídou (Obr. 10).

Diagnostika orální mukositivity



Obr.11.
Diferenciální diagnostika orální mukositivity.

5.3.3. Profylaxe a léčba orální mukositivity v souvislosti s transplantací kostní dřeně

Léčebné algoritmy orální mukositivity OM						
Příprava pacienta	Prevence			Léčba		Léčba bolesti
	Prevence OM v průběhu chemotapie	Prevence OM po transplantaci kostní dřeně	Prevence sekundární infekce	Lokální terapie	Systémová terapie	
Klinické vyšetření	Kryoterapie	<i>Péče o orální hygienu</i>	<i>Antivirotika</i>	<i>Sukralfát</i>	<i>Vitamin A + E</i>	<i>Ochranné gely (Gel Clear)</i>
Klinické ošetření		<i>Orální antiseptika</i>	<i>Antimykotika (lokálně, celkově)</i>	<i>Prostaglandin E2</i>	<i>Aminofostin</i>	<i>Benzidamin</i>
Použití měkkých laserů		<i>Eliminace agresivní stravy</i>	<i>ATB</i>	<i>Cytokiny</i>	<i>Keratinocyty růstový faktor (Palyfermin)</i>	<i>Lidocain, Xylocain (lokálně)</i>
		<i>Léčiva -Pilocarpin</i>		<i>Růstové faktory G-CSF + GM-CSF</i>	<i>Růstové faktory G-CSF + GM-CSF</i>	<i>Opiáty (celkově)</i>
			<i>Orální antiseptika</i>			

Tab.6.

Přehled léčebných algoritmů orální mukositivity OM

Příprava pacienta na transplantaci (min. 3 týdny před transplantací)

Tři týdny před zahájením myeloablativní chemoterapie je nezbytné provedení **standardního stomatologického vyšetření**, včetně zhotovení ortopantomogramu a parodontologického vyšetření (PBI, CPITN, OZK)^{60,61}. Nezbytnou součástí **klinického ošetření** pacienta je odstranění potenciálních zdrojů odontogenní fokální infekce a ohlazení ostrých hran zubů a protéz. Velice důležité je poučení pacienta o správné technice čištění zubů (Stillmanova metoda), o škodlivosti kouření, alkoholu a konzumaci dráždivé stravy v průběhu chemoterapie (podrobněji kapitola 7). V experimentu se v posledních letech jeví účinné použití **biostimulačních laserů** ke zvýšení reparabilní funkce sliznic^{62,63}.

Prevence orální mukositis v průběhu myeloablativní chemoterapie Melphalanem.

V prevenci orální mukositivity u nemocných léčených s mnohočetným myelomem je v průběhu myeloablativní chemoterapie Melphalanem využívána **kryoterapie**. Je prováděna oblémy kostkami ledu, které pacient vkládá do úst 15 minut před, 15 minut v průběhu aplikace cytostatika a 30 minut po ukončení infuze Melphalanu. Mechanismus účinku je založen na vazokonstrikci slizničních kapilár a tím dosažení menšího průniku cytostatika do dobře prokrvené sliznice^{65,66,67}.

Prevence orální mukositivity po transplantaci kostní dřeně

Po transplantaci kostní dřeně je nezbytné, aby pacienti pokračovali v dokonalé hygieně, vyvarovali zlovykům a stravě agresivní vůči hypoplastické sliznici⁶⁸. U pacientů s projevy postchemoterapeutické trombocytopenie a orální mukositivity vyššího stupně se doporučuje mechanické stírání zubů tamponem jako prevence vzniku krvácení z dásní. Velice účinné jsou **výplachy dutiny ústní** antiseptiky (Listerine) či bikarbonáty, ředěnými v poměru - 7,5 ml ve 500ml H₂O₂, nebo 1,4g ve 100ml destilované vody⁶⁹⁻⁷³ (Tab. č. 7). (podrobněji kapitola 7). Velice důležitá je u některých pacientů kompenzace postchemoterapeuticky navozené xerostomie např. methyl-celulózou, mukopolysacharidy či medikamentózně Pilocarpinem. U bezzubých pacientů se doporučuje omezit používání totálních náhrad výhradně pro konzumaci nedráždivé potravy měkké konzistence (prevence vzniku dekubitů a následných slizničních lézí).

Stupeň – OM	0	1	2	3	4
Frekvence vyšetření	24h	24h	12h	8h	4h
Druh medikace	CHX/H ₂ O	CHX/H ₂ O/ SB	CHX/H ₂ O/ SB	CHX/SB/ AM	CHX/SB/ AM
Frekvence medikace	Po jídle	6h	4h	2h	2h
Lubrikace rtů	Každých 8h	Každých 6h	Každou 4h	Každou 2h	Každou h

Tab.7.

Navrhnutá léčba orální mukositivity OM orálními antiseptiky a lokálními antimykotiky,
dle stupně postižení

(CHX – 0,12% chlorhexidin, SB – roztok bikarbonátu, AM – antimykotika - Nystatin)

Prevence sekundární infekce orální sliznice

Profylaxe sekundární infekce orální sliznice spočívá v podání antimykotik. K prevenci vzniku orální kandidózy (aspergilózy), je vhodná jejich lokální (Nystatin, Imidázolová ATM - Clotrimazol, Flukonazol, Amfotericin B) nebo systémová (Flukonazol, Amfotericin B) aplikace. *Antivirotika* zajišťují profylaxi virových onemocnění (herpes simplex typ I, varicella zoster), ve formě lokálně i celkově aplikovaného Acykloviru. V neposlední řadě jsou využívána *antibiotika* penicilinové a cefalosporinové řady, k profylaxi bakteriálních onemocnění vyvolané oportunní bakteriální flórou dutiny ústní (Streptokoky, Staphylokoky, Pseudomonady, Staphylococcus, Bacteriodes, Veillonella)⁶¹.

Lokální použití léčiv s protizánětlivým a ochranným účinkem na sliznici

Podle zahraničních literárních pramenů je snaha využít systémově používaná léčiva i v lokální terapii⁷⁴. *Sukralfát* jako medikament na bázi soli hliníku, používaný u léčby žaludečního vředu, tvoří na sliznici ochranný plášť a aktivuje Prostaglandin E2 s ochranným účinkem na epitelální buňky. Sukralfát stimuluje také epitelální migraci i proliferaci, zvyšuje prokrvení sliznice a zvyšuje tvorbu mucinu. *Prostaglandin E2* (indometacin) jako inhibitor cyklooxygenázy, působí ochranným účinkem na epitelie sliznice. Lokálně aplikované *Cytokiny*, transformující růstový faktor beta 3 (TGF-β3), působí jako inhibitor proliferace bazálních buněk s kladným účinkem na stabilizaci buněčné membrány. In vitro tento medikament aplikovaný profylakticky snižuje četnost orální mukositivity. V lokální aplikaci formou výplachů dutiny ústní se uplatnily *růstové faktory*, standardně využívané systémově G-CSF + GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor + granulocyte macrophage colony stimulating factor), které zvyšují počet aktivovaných neutrofilů ve sliznici a tím aktivují keratinocyty a fibroblasty a další buňky potřebné k reparaci slizničního epitelu.

Celkově aplikovaná léčiva

V systémové terapii orální mukosity jsou využívány **vitamíny skupiny A** a jeho deriváty působící svým protizánětlivým účinkem⁷⁴. Vitamíny A zpomalují buněčné dělení, epiteliální membrána se patrně stává stabilnější, což zvyšuje rezistenci epiteliálních buněk vůči cytotoxické léčbě. **Vitamíny skupiny E** jakožto antioxidanty a stabilizátory epiteliální membrány se využívají vůči volným radikálům vznikajících v průběhu orální mukosity⁷⁴.

Amifostin jako antioxidant chrání buňky selektivně, ve smyslu prevence maligního zvratu. Amifostin má ochranný účinek na epiteliální buňky, avšak pro jeho časté vedlejší účinky (nausea, hypotenze) je jeho využití diskutabilní. **Růstový faktor stimulující keratinocyty** (Palyfermin) je velice účinná látka, která stimuluje dělení a zrání epiteliálních buněk, kromě výborného terapeutického účinku má také negativní vedlejší účinky, jako je poteciace maligního zvratu prekanceróz. V neposlední řadě to jsou **růstové faktory** dnes plně využívané po transplantaci kostní dřeně, v přesně stanovených léčebných algoritmech G-CSF + GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor + granulocyte macrophage colony stimulating factor).

Léčba bolesti při projevech orální mukosity

Orální mukositida se vyznačuje celkovým diskomfortem dutiny ústní, tedy hlavně bolestivostí, jejíž intenzita je přímo úměrná jejímu stupni postižení. Při lehkém postižení orální sliznice, dle klasifikace NCI – CTC, využíváme **lokálně aplikovaná anestetika**, (Benzidamin - protizánětlivé agens s anestetickým účinkem, Xylocain gel, Lidocain). Při závažných orálních mukositidách jsou často využívány systémově aplikované **opiáty**.

6. Cíle práce

Obecně akceptovaným objektivním ukazatelem přihojení autologního štěpu periferních krvetvorných buněk po myeloablativní chemoterapii při léčbě hematologických malignit je stanovení hladiny neutrofilů v periferní krvi. Některé zahraniční prameny v poslední době upozorňují na alternativní možnost hodnocení přihojení, kterou je stanovení hladiny neutrofilů ve slině. Zvládnutí komplikací léčby a kvalita života nemocných během hospitalizace jsou do značné míry determinovány klinickou manifestací orálních mukosítid.

Cílem práce je

- u nemocných léčených pro hematologické malignity stanovit racionální algoritmus preventivních i kurativních stomatologických výkonů s cílem omezit závažnost vedlejších účinků chemoterapie na sliznici ústní dutiny
- stanovit časovou posloupnost mezi vzestupem počtu neutrofilů ve slině a v periferní krvi po převodu autologního štěpu periferních krvetvorných buněk a vysocedávkované myeloablativní chemoterapii

7. Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 45 pacientů (23 mužů a 22 žen) léčených na Hematoonkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc v letech 2006 – 2009 (Tab. 8). Všichni nemocní byli léčeni dle ustanovených léčebných protokolů pro ne-hodgkinské lymfomy, Hodgkinovu nemoc a mnohočetný myelom. Před zařazením do studie podepsali písemný souhlas s léčebným protokolem, který byl předem schválen etickou komisí.

Minimálně 3 týdny před zahájením myeloablativní chemoterapie bylo provedeno standardní stomatologické vyšetření (včetně zhotovení OPG), parodontologické vyšetření a odstranění potenciálních zdrojů mechanického dráždění sliznic (obroušení ostrých hran zubů a zubních náhrad). Součástí přípravy pacienta před transplantací byl nácvik Stillmanovy metody čištění zubů a poučení o škodlivosti kouření, alkoholu a

konzumaci dráždivé stravy v průběhu chemoterapie. V rámci eliminace potencionálních zdrojů odontogenní fokální infekce jsme přistoupili k extrakcím gangrenózních zubů, zubů s rentgenologicky prokazatelnými periapikálními nálezy, částečně prořezaných třetích molárů s klinickými projevy perikoronitidy a zubů s viklavostí II. – III. stupně s aktivními parodontálními choboty. ***Zuby nedokonale endodonticky ošetřené, klinicky nereagující na poklep a testy vitality, které měly negativní RTG nález jsme neextrahovali.*** Součástí vstupního stomatologického vyšetření bylo také stanovení PBI, CPITN a odstranění zubního kamene ultrazvukem. Pacienti s klinickými projevy gingivitid zařazení do studie absolvovali před zahájením chemoterapie týdenní léčebnou kúru orálním antiseptikem (2x denně výplachy Listerine). Do studie nebyli zařazeni pacienti s těžkými parodontitidami, kteří odmítali extrakce zubů a nemocní se špatnými hygienickými poměry v ústní dutině, kteří neměli zájem spolupracovat.

K čištění chrupu výše zmíněnou Stillmanovou metodou jsme nemocným doporučili extra měkký kartáček (Curaprox ultra soft) a zubní pastu (Lacalut).

U nemocných s nízkým počtem krevních destiček ($\geq 30 \times 10^9/l$), v prevenci gingiválního krvácení, jsme zajistili hygienu dutiny ústní mechanickým stíráním tamponem či vatou doplněnou irigací dásní antiseptiky. Pacienti s celkovými a parciálními náhradami používali protézy pouze při konzumaci nedráždivých jídel v rámci prevence vzniku slizničních dekubitů a následných slizničních lézí. Protézy byly pravidelně mechanicky čištěny a dezinfikovány v antiseptických roztocích.

V prevenci rozvoje orální mukositivity v průběhu léčby cytostatiky, vedle výplachů slizničním antiseptikem Listerine (Pfizer) prováděných 2x denně, se u nemocných s mnočetným myelomem osvědčila kryoterapie. Podstatou protektivního účinku této metody je navození vazokonstrikce krevních kapilár. V důsledku správně načasované krátkodobé ischemizace ústní sliznice tak docházelo ke snížení nežádoucího účinku cytostatika na buňky sliznice dutiny ústní. Zmíněnou profylaxi orální mukositivity nemocní vesměs velmi dobře snášeli. Jen u několika pacientů jsme museli přípravek Listerine pro nepříjemný pocit pálení v ústech ředit sterilní vodou v poměru 1 : 1.

Pacienti s ne-hodgkinskými lymfomy a Hodgkinovou chorobou byli léčeni kombinovanou myeloablativní chemoterapií BEAM ve složení BCNU, Cytosar (Cytarabin), Vepesid (Etoposid), Alkeran (Melphalan). V případě mnohočetného myelomu se jednalo o monoterapii vysoce dávkovaným Alkeranem (Melphalan). 24 hodin po aplikaci myeloablativní chemoterapie byl u všech pacientů (v podmínkách

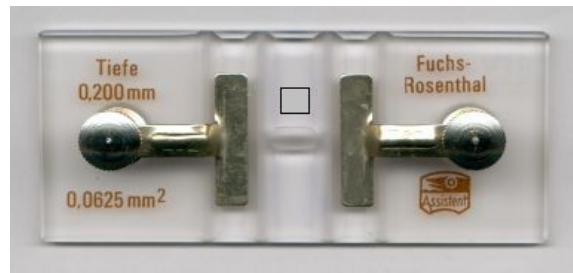
reverzní izolace a selektivní dekontaminace GIT) proveden převod vlastních periferních kmenových buněk.

K akceleraci přihojení neutrofilů byly nemocným podávány růstové faktory (G – CSF). Úspěšnost přihojení štěpu byla hodnocena na základě vyšetření krevního obrazu (včetně diferenciálního) a stanovení hladiny neutrofilů a trombocytů v krvi. Součástí podpůrné léčby bylo preventivní podávání antimykotik, antibiotik, chemoterapeutik a virostatik. Standardně byla aplikována kombinace fluconazolu, fluorochinolonů, cotrimoxazolu a acykloviru.

Dg.	Počet	Ženy	Muži	Průměrný věk	Přípravný režim
Nehodgkinské lymfomy	25	10	15	50	BEAM
Mnohočetný myelom	15	8	7	57	HD melphalan
Hodgkinův lymfom	5	4	1	39	BEAM
Celkem	45	22	23	50	

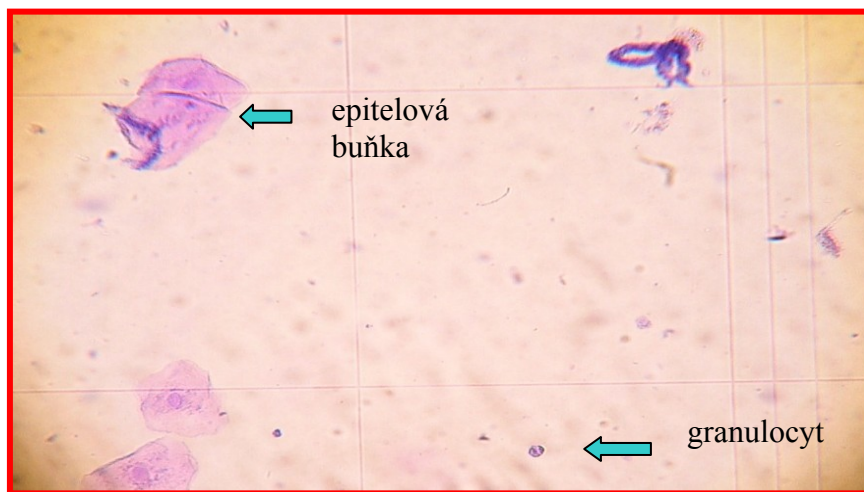
Tab. 8.
Vyšetřovaný soubor pacientů

Paralelně s vyšetřením hladiny neutrofilů v séru jsme sledovali přítomnost neutrofilů ve slině. Odběr vzorků sliny byl zahájen v den 0 (v den převodu štěpu krvetvorných buněk). Pacienti si vyplachovali dutinu ústní 10 ml sterilní vody po dobu 30 sekund každé ráno před snídaní a hygienou dutiny ústní, kdy je předpokládána hladina neutrofilů nejvyšší. Takto získaný materiál byl centrifugován (10 minut/1100 ot.) a přebytečná tekutina odsáta tak, aby zůstal 1 ml sedimentu. Sediment byl obarven methylvioletí, která dává neutrofilům s typickým tvarem jádra dobrou rozpoznatelnost od ostatních buněk a epitelii. Vzorky byly odečítány pod světelným mikroskopem ve Fuchs – Rosenthalově komůrce při 50 násobném zvětšení v 16 velkých čtvercích (obr. 12, 13). O víkendech a svátcích byl materiál konzervován 2 ml 39% formaldehydu, skladován při teplotě 4 °C a zpracován první následující pracovní den. Tím byla zachována kontinuita hodnocení jednotlivých výsledků. Vyšetření vzorků sliny pokračovala denně až do prokazatelně úspěšného přihojení štěpu. Pro získání referenčních hodnot hladiny neutrofilů ve slině byl všem pacientům před zahájením myeloablativní chemoterapie stejným způsobem jednorázově odebrán a zpracován vzorek sliny.



Obr.12

Fuchs – Rossenthalova komůrka



Obr.13

Mikroskopický obraz preparátu

Posouzení vývoje slizničních změn v průběhu chemoterapie a po jejím ukončení bylo založeno na denním intraorálním vyšetření pacienta a na subjektivním vyhodnocení stavu orální mukositivity. V tabulce č. 9 uvádíme příklad použitého schématu NCI - CTC založeného na objektivním vyhodnocení stavu sliznice, který byl zakreslen do námi připraveného schématu (obr 14).

0	1	2	3	4
Žádná reakce	Nebolestivá ulcerace, mírná bolestivost	Bolestivý erytém, otok, ulcerace (může jíst)	Bolestivý erytém, otok, ulcerace (nemůže jíst)	Těžké poškození sliznice (nutná parenterální nebo enterální výživa)

Tabulka č. 9
Schéma hodnocení slizničních změn (NCI – CTC)

Jméno-

příjmení-

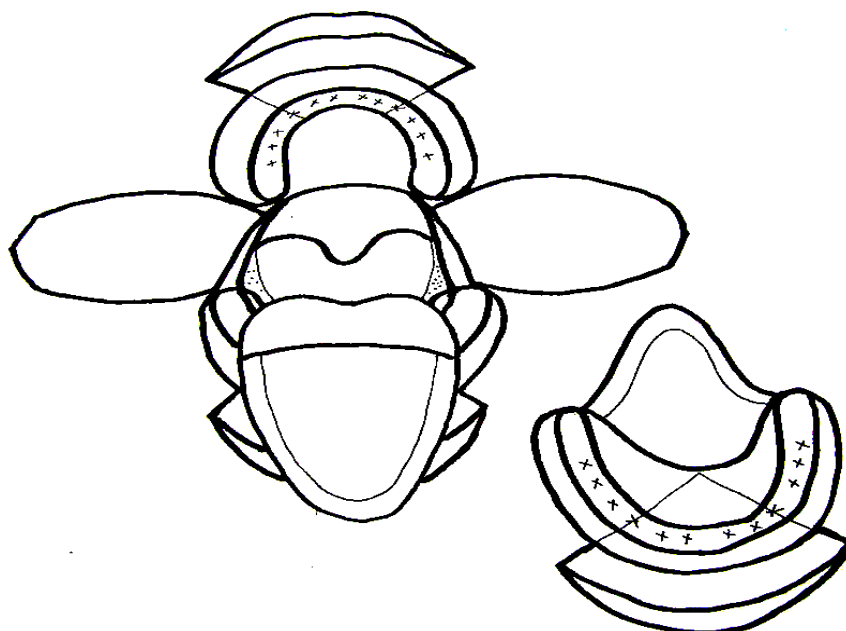
Datum vyšetření-

Lokalizace léze

	Rty		Labiální sliznice		Bukální sliznice	
	<i>horní</i>	<i>dolní</i>	<i>horní</i>	<i>dolní</i>	<i>vpravo</i>	<i>vlevo</i>
Otok						
Erytém						
Ulcerace						

	Jazyk				Patro		
	<i>dorsální</i>	<i>laterální</i>	<i>ventrální</i>	<i>spodina jazyka</i>	<i>tvrdé</i>	<i>měkké</i>	<i>gingiva</i>
Otok							
Erytém							
Ulcerace							

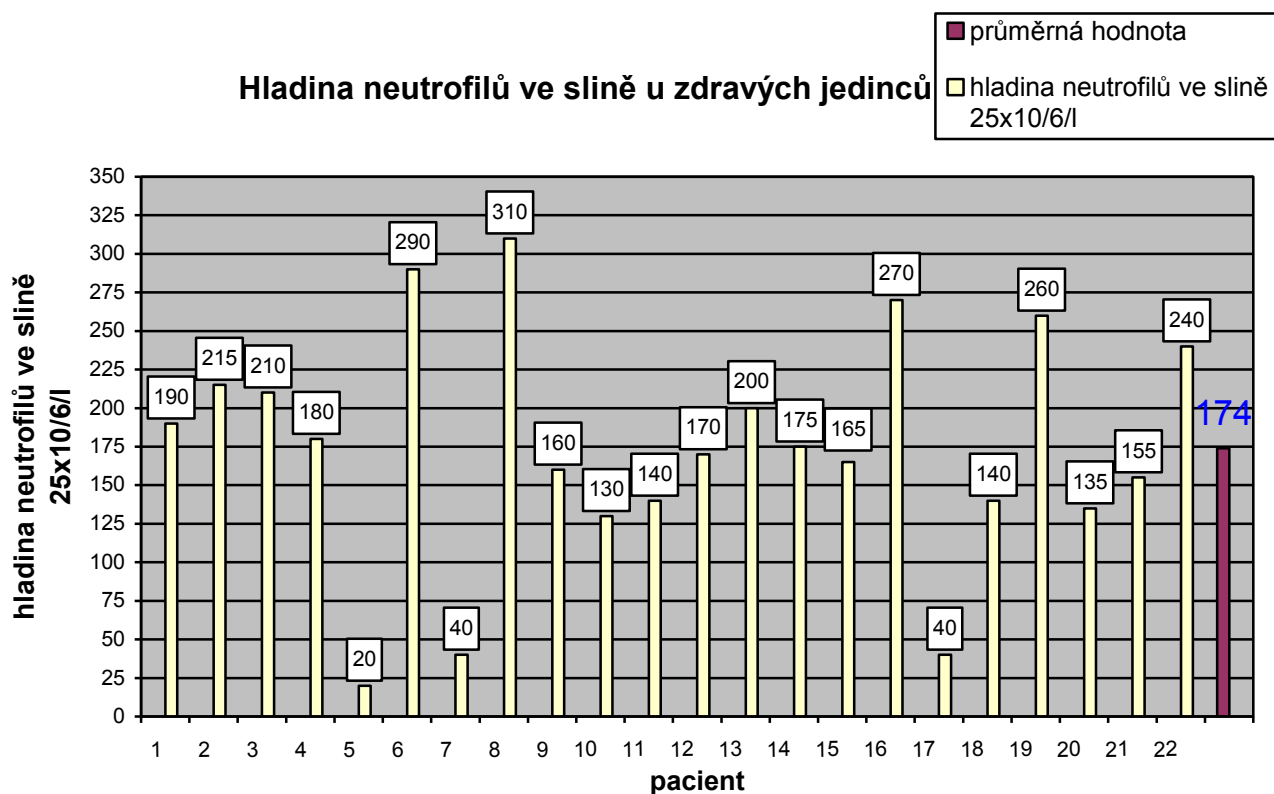
Grafické, barevné rozlišení lézí podle charakteru (eroze - zeleně, erytém – modře, ulkus- červeně)



Obr.14.
Schéma na zakreslení orální mukositis lékařem

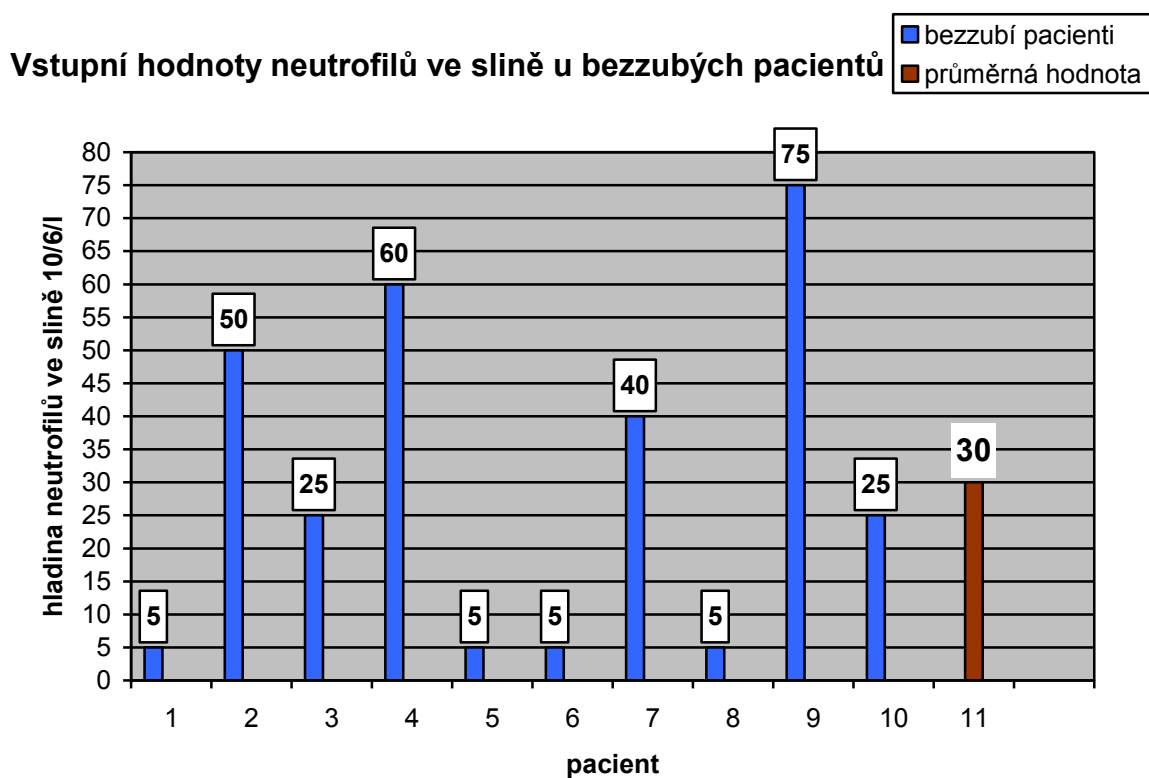
8. Výsledky

Pro porovnání hodnot neutrofilů ve slině zdravých a nemocných jedinců bylo nejprve třeba stanovit jejich fyziologické hodnoty. Vzorokly sliny byly odebrány výše popsanou metodikou 22 zdravým jedincům-dobrovolníkům, nezatížených zánětem tkání v dutině ústní. Materál byl vyšetřen výše popsaným způsobem (viz str. 47). Průměrná hodnota neutrofilů ve slině byla $174 \times 10^6/l$ (graf č. 1), která přibližně odpovídá vstupním hodnotám neutrofilů 45 pacientů se zachoalým chrupem ($158 \times 10^6/l$), (graf č. 2). Můžeme tedy konstatovat, že soubor našich hematookologických pacientů byl ze stomatologického hlediska dobře připraven a nedocházelo ke zkreslování výsledků hladin neutrofilů ve slině záněty sliznice dutiny ústní.

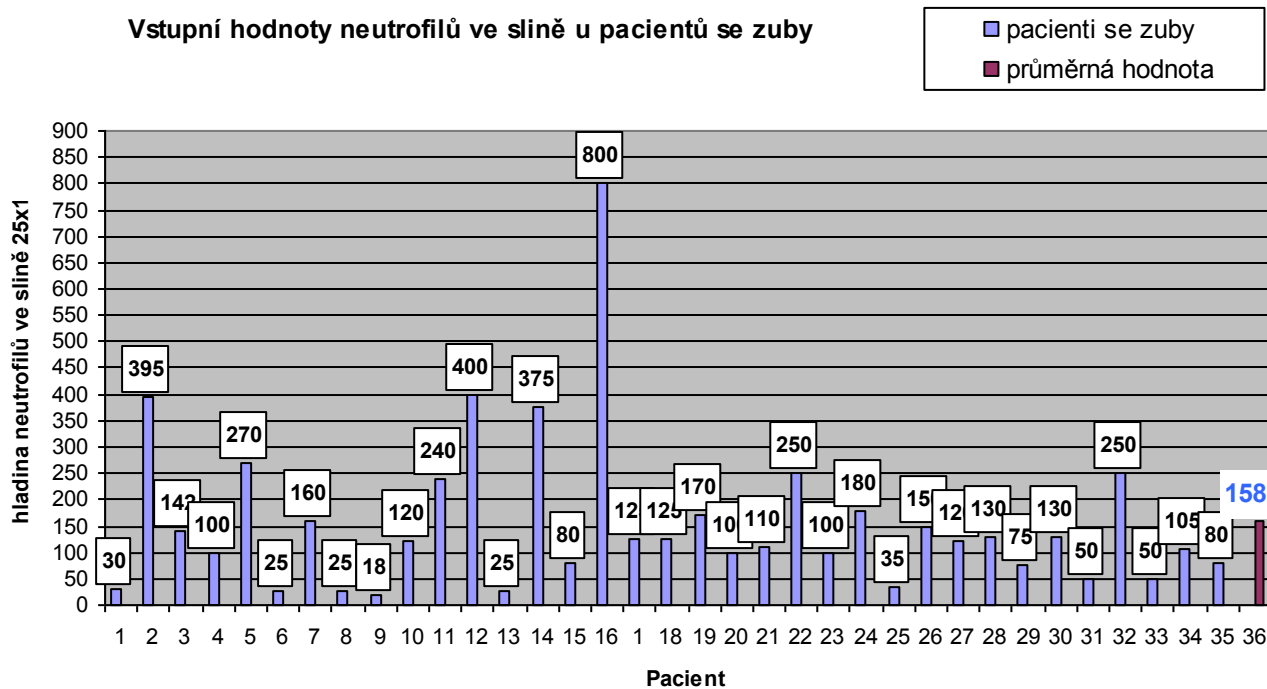


Graf. 1.
Hladina neutrofilů ve slině u hematologicky zdravých jedinců

Pro posouzení úspěšnosti hematooonkologické léčby bylo důležité také stanovení výchozí hladiny neutrofilů ve slině před zahájením chemoterapie. Vyšší vstupní hodnoty neutrofilů jsme prokázali ve slině ozubených pacientů v porovnání s bezzubými (graf č. 2 a 3). Průměrná hodnota neutrofilů u ozubených pacientů byla $158 \times 10^6/l$ zatímco u bezzubých pacientů tato hodnota dosáhla $30 \times 10^6/l$.



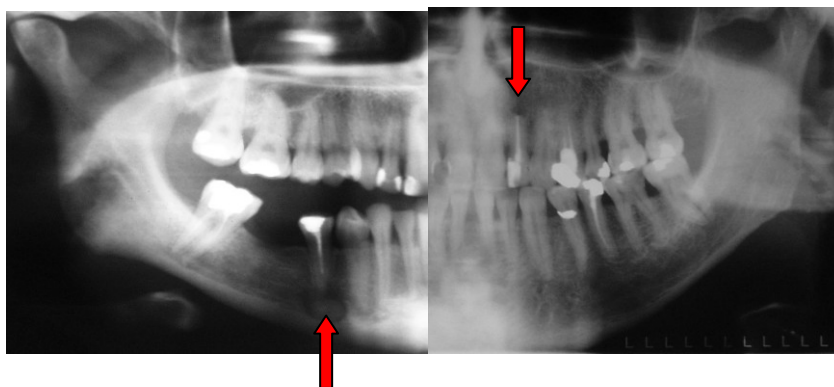
Graf. č. 2.
Vstupní hodnoty neutrofilů ve slině u bezzubých pacientů



Graf. Č. 3
Vstupní hodnoty neutrofilů ve slině u pacientů se zuby

V průběhu chemoterapie a následné posttransplantační léčbě jsme u žádného pacienta nezaznamenali zánětlivé projevy měkkých či tvrdých zubních tkání s následným septickým stavem organismu (Obr. 15).

2

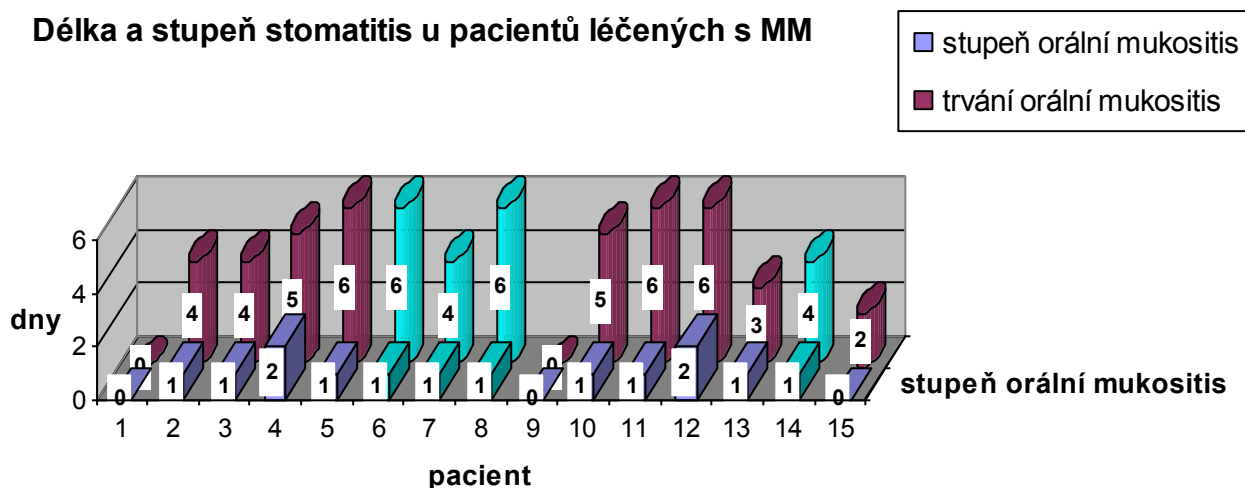


1

Obr. č. 15
Příklad OPG snímků s endodonticky ošetřenými zuby. V 1. případě nedokonalě ošetřený zub s cystou – určený k extrakci. Ve 2. případě endodonticky dobře ošetřený zub, který podle našich zkušeností není třeba extrahovat.

U 45 nemocných, zařazených do studie jsme pozorovali nejčastěji I. stupeň orální mukositivity. U tří pacientů léčených kombinovanou chemoterapií (pacient 3,11,22) pro ne-hodgkinský lymfom, jsme zaznamenali mezi 6. – 9. dnem III. stupeň slizničních změn, při němž hladiny neutrofilů dosahovaly nulových hodnot jak ve slině tak v krvi (Obr. č. 16). V celém souboru pacientů jsme nepozorovali orální mukositivity IV. stupně. Větší agresivita a toxicita kombinované chemoterapie na buňky sliznice dutiny ústní nepříznivě ovlivnila závažnost slizničních změn s ohledem na její časový průběh (graf. č. 4 a 5).

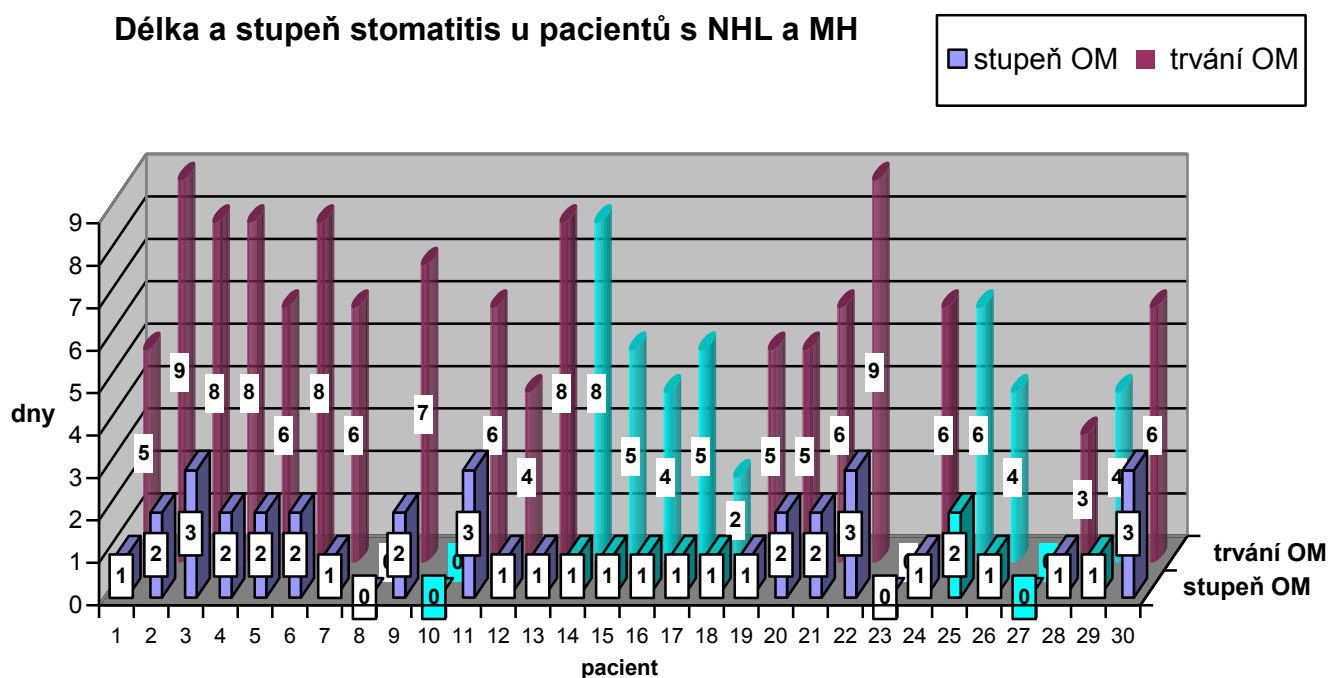
Délka a stupeň stomatitidy u pacientů léčených s MM



Graf.č. 4.

Trvání a dosažení nejvyššího stupně u nemocných léčených pro myelom.
 Poznámka – pacienti č. 6,7,8 – hladiny neutrofilů neklesly na nulovou hodnotu. MM – mnohočetný myelom.

Délka a stupeň stomatitis u pacientů s NHL a MH



Graf.č. 5

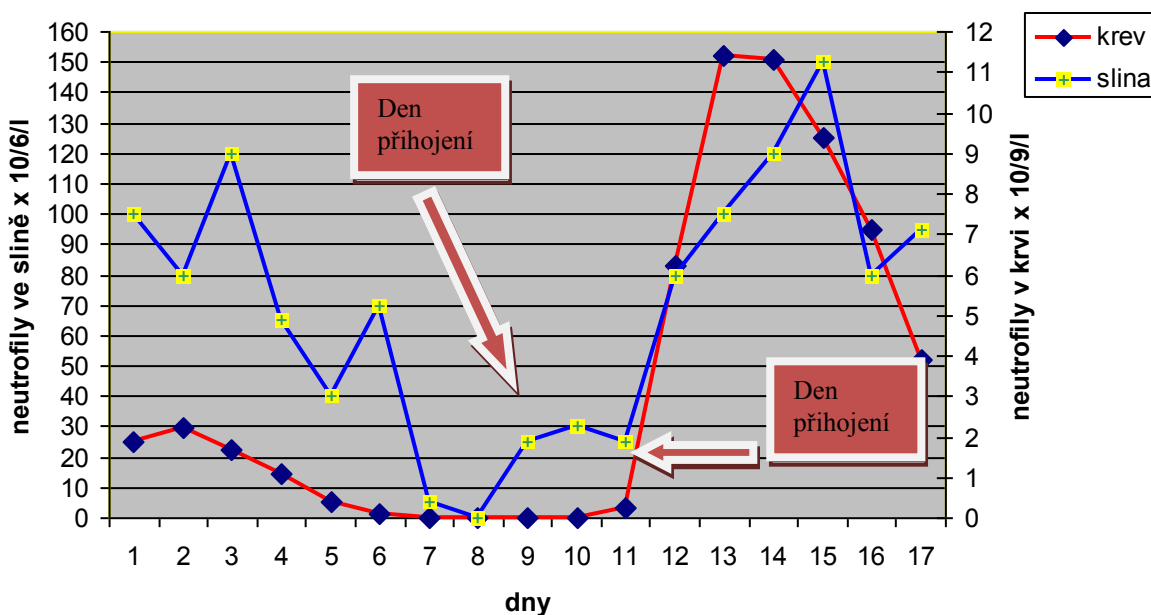
trvání a dosažení nejvyššího stupně u nemocných léčených pro lymfomy.
 Poznámka – pacienti č. 10,15,16,17,18 – hladiny neutrofilů neklesly na nulovou hodnotu NHL – ne-hodgkinský lymfom, MH – Hodgkinova nemoc.



Obr. č. 16

Příklad pacientky s orální mukositidou III. stupně, lokalizovanou na bukální sliznici levé tváře, sedmý den po autologní transplantaci kostní dřeně.

Obecně akceptovaným ukazatelem úspěšného přihojení štěpu je dosažení hladiny granulocytů v periferní krvi $0,5 \times 10^9/l$ po 3 po sobě následující dny. Vzestup počtu neutrofilů ve slině probíhá obdobně, ve většině případů s časovým předstihem před zvýšením hladiny neutrofilů v krvi. Hladina granulocytů ve slině signalizující úspěšné přihojení štěpu je $25 \times 10^6/l$ po dva po sobě následující dny, což zhruba odpovídá 1 neutrofilu na 4 zorná pole ve Fuchs – Rosenthalově komůrce. Typickou, kolísavou křivku hladiny neutrofilů ve slině po převodu autologního štěpu se strmým sestupem neutrofilů k nulovým hodnotám a s jejich následným rychlým zvýšením demonstruje graf č. 6.



Graf č. 6

Příklad kolísání hladin neutrofilů ve slině a krvi u vybraného hematologického pacienta po autologní transplantaci kostní dřeně a imunosupresivní léčbě

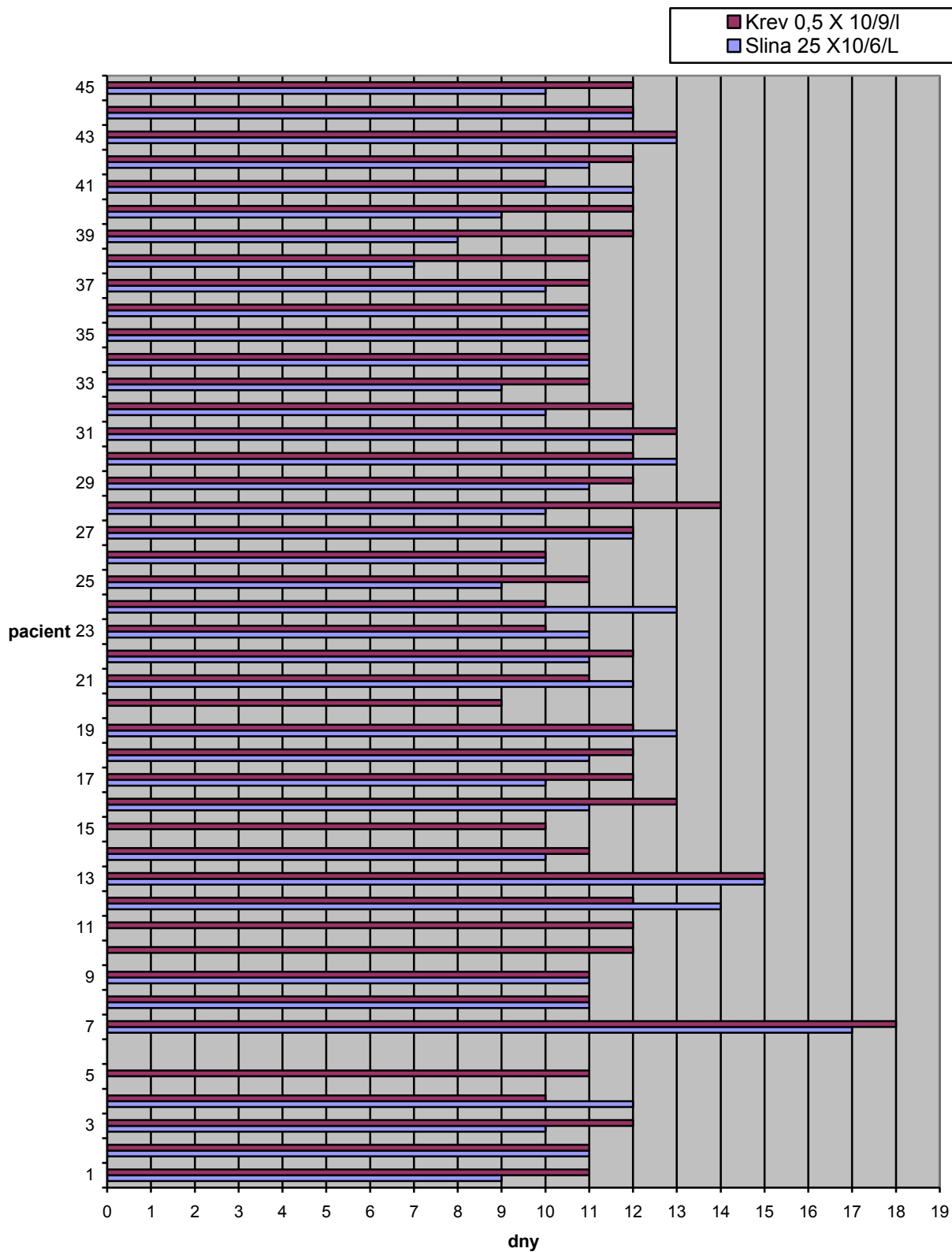
U dvaceti nemocných (pacienti 1, 3, 7, 14, 16, 17, 18, 22, 25, 28, 29, 31, 32, 33, 37,38,39,40,42,45) zařazených do naší sestavy bylo dosaženo hladiny neutrofilů ve slině signalizující úspěšné přihojení štěpu přibližně o 1 – 2 dny dříve než v periferní krvi (graf č.7), (tab.č.10).

U deseti nemocných (pacient 2,8,9,13,27,34,35,36,43,44) byl požadovaný vzestup zaznamenán ve slině i v krvi ve stejný den (graf č.7), (tab.č.10).

Osm pacientů (pacient 4,12,19,21,23,24,30,41) dosáhlo přihojení kostní dřeně v periferní krvi dříve než ve slině (graf č.7), (tab.č.10)

V šesti případech (pacient 5,10,11,15,20,26) jsme výsledky hladin neutrofilů ve slině nehodnotili, pro nedosažení požadované hodnoty $25 \times 10^6/l$ (pacient 10,11,26) nebo naopak pro setrvání vysokých hodnot neutrofilů (pacient 5,15,20), které nedosáhly nulových či nule blízkých hodnot (graf č.7). Nedosažení požadovaných hodnot neutrofilů ve slině bylo zaznamenáno hlavně u pacientů bezzubých, kde je primární vstupní hodnota neutrofilů nižší v porovnání s pacienty se zuby. V opačném případě, u setrvání vysokých hodnot neutrofilů se mohlo jednat o klinicky se neprojevuující zánět měkkých tkání dutiny ústní po převodu štěpu.

V jednom případě (pacient 6) nebyly dosaženy hladiny neutrofilů signalizující úspěšné přihojení kostní dřeně ani ve slině, ani v krvi (graf č.7).



Graf. č. 7
 Časová diference mezi dosažením požadovaných hladin neutrofilů ve slině a v krvi. Sloupce reprezentují den, v němž došlo k přihojení štěpu dle definovaných kritérií.

	všichni	MM	NHL+MH
není rozdíl v přihojení	10x	3x	7x
dříve neutrofilů ve slině	20x	5x	15x
dříve granulocyty v krvi	8x	3x	5x

Tab. č. 10
Časový rozdíl v přihojení dle hladin neutrofilů ve slině a periferní krvi

Dle středních hodnot bílých krvinek ($WBC > 0,5 \times 10^9/l$) všichni pacienti přihojili v den 12 (9-18), nemocní s myelomem 12 (10-13) a pacienti s lymfomy 11 (9-18).

Ve slině dle hladiny neutrofilů ($> 25 \times 10^6/l$) všichni pacienti přihojili v den 11 (9-17), s myelomy 11 (9-14), s lymfomy 11 (9-17) (tab. č. 11).

Přihojení dřeně(dny)	WBC > $0,5 \times 10^9/l$	Slina > $25 \times 10^6/l$
všichni	12 (9-18)	11 (9-17)
myelom	12 (10-13)	11 (9-14)
lymfomy	11 (9-18)	11 (9-17)

Tab. č. 11
Střední hodnoty přihojení kostní dřeně dle hladin neutrofilů ve slině a krvi

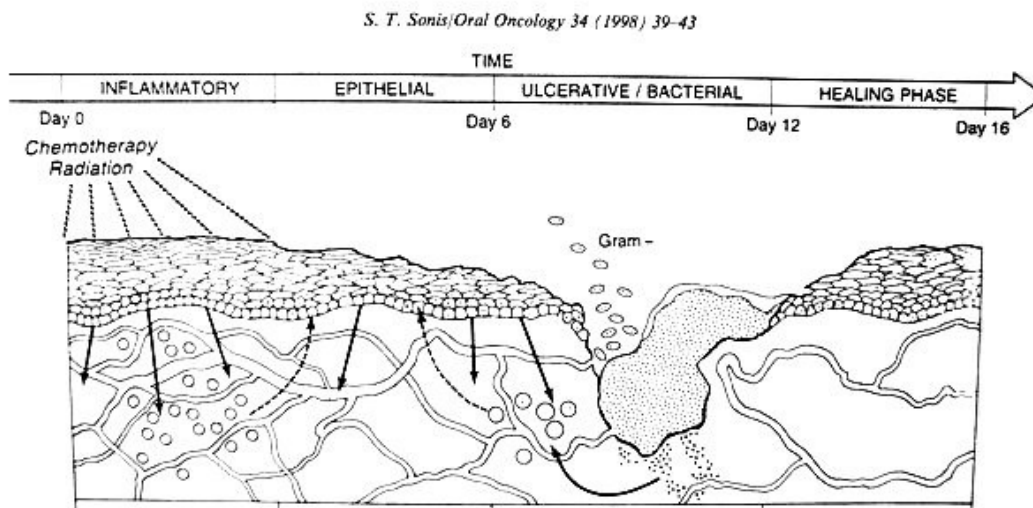
Celkem u 14 pacientů neklesly hladiny neutrofilů ve slině na nulovou hodnotu, ale k nule blízkým hodnotám, v rozmezí hodnot $5 - 15 \times 10^6/l$ (jako nulovou hodnotu jsme brali nejnižší dosaženou hodnotu). Konkrétně se jednalo o 4 pacienty léčené pro myelom (pacienti 6,7,8,14) a 10 pacientů léčených pro NHL (pacienti 10,14,15,16,17,18,25,26,27,29), (graf č. 5 a 6). U žádného z těchto pacientů nepřesáhla orální mukositis I. stupeň závažnosti, což je pozoruhodné zvláště u NHL pacientů léčených kombinovanou chemoterapií – BEAM. Tento fakt jasně dokazuje hojivý efekt neutrofilů na sliznici dutiny ústní.

9. Diskuse

Orální mukositidy jako komplikace myeloablativní chemoterapie se nejčastěji manifestují na bukální sliznici a na spodině dutiny ústní a jazyka. Sliznice tvrdého patra a gingivy jsou vůči toxickému působení cytostatik relativně odolné. Vyvolávajícím momentem ohraničených slizničních lézí může být také mechanické dráždění ostrými okraji zubů, jejich kořenů nebo zubních náhrad. Významnou roli hraje samozřejmě i sekundární infekce bakteriálního, virového nebo mykotického původu. Sanace chrupu a odstranění potenciálních zdrojů odontogenní fokální infekce je proto u všech hematologických pacientů před plánovanou transplantací kostní dřeně nezbytností.

Literární údaje z poslední doby naznačují, že v patogenezi orálních mukositid se neuplatňuje pouze toxický vliv radioterapie a chemoterapie na dělení buněk. Zdá se, že z hlediska patogeneze má orální mukositis 4 biologická stadia (Obr. 17)^{75,76}:

- iniciální stadium
- stadium progresse
- stadium ulcerace
- stadium hojení.



Sonis/Oral Oncology 34 (1998) 39 – 43.

Obr. č. 17

Názorné schéma průběhu orální mukositidy v horizontu 14 dní.

Nejednotnost hodnotících schémat užívaných při klasifikaci orálních mukosítid neumožňuje korelaci mezi závažností toxických účinků myeloablativní chemoterapie a efektivitu léčby. Nejčastěji užívaná jsou schémata WHO a NCI – CTC^{59,61}.

Standardní součástí prevence a léčby orálních mukosítid je použití orálních antiseptik. V literatuře byla na toto téma publikována řada prací, jejichž závěry nejsou zcela jednoznačné. Např. Vokurka a spol. nenalezli rozdíly mezi použitím jodidových preparátů jako orálních antiseptik ve srovnání s fyziologickým roztokem⁷². Preparát Listerine (Pfizer) který jsme použili u našich pacientů je antiseptikum složené z esenciálních olejů (thymol, eucalyptol, methyl salicylát, mentol) a alkoholu. Antibakteriální mechanismus jeho účinku je založen na bloádě buněčného metabolismu^{69,70,71}. K tomu přistupuje ještě účinek antimykotický a antivirotický. Listerine přitom nenarušuje rovnováhu bakteriální flóry dutiny ústní a nezabarvuje sklovinu zubů při dlouhodobém užívání. Má také velice dobrý terapeutický vliv na zánětlivé onemocnění parodontu. (graf č. 8).

Rovněž využití zkráceného cyklu kryoterapie v prevenci orální mukosítidy prováděnou oblými kostkami ledu 15 minut před chemoterapií, 15 minut v průběhu chemoterapie a 30 minut po chemoterapii se ukázalo být dostatečně účinné. Je tedy možno souhlasit s názorem, že dlouhodobá kryoterapie by byla pro pacienta zbytečně zatěžující⁶⁴⁻⁶⁷.

Komplementární možností léčby orálních mukosítid jsou měkké lasery^{62,63}, aplikované na oblast slizničních lézí, případně vitamin A a E, které jsme u našich pacientů nevyužili⁷⁴. V zahraničí se v poslední době osvědčilo také systémové podání Paliferminu, růstového faktoru keratinocytů. Ten má bohužel také významné negativní vedlejší účinky, jako je možnost indukce karcinomu tlustého střeva u familiární polypózy⁷⁷. Navíc jeho použití je v současné době finančně neúnosně náročné.

V souboru 45 pacientů léčených pro mnohočetný myelom, ne-hodgkinské lymfomy a Hodgkinovu nemoc s následnou autologní transplantací periferních krvetvorných buněk, bylo úspěšné přihojení štěpu signalizováno vzestupem hladiny neutrofilů ve slině v průměru o 1 - 2 dny dříve než v periferní krvi^{78,79,80}.

Časový interval úspěšného přihojení štěpu kostní dřeně je do značné míry ovlivněn algoritmem myeloablativní chemoterapie. Časová diference mezi dosažení

příznivých hladin neutrofilů ve slině a v krvi může odpovídat rizikům infekcí a septických stavů vyskytujících po přihojení štěpu⁷⁸. Čím delší je tento časový interval, tím menší je riziko infekčních komplikací. Tento názor vychází z předpokladu postupného „přednostního“ sycení tkání neutrofilů. Vyšší obsah neutrofilů ve tkáních znamená proto lepší obranyschopnost organismu. Tato teorie by však spíše svědčila pro průnik neutrofilů do dutiny ústní penetrací tkání. Tento mechanismus naše závěry nepotvrdily, protože jsme prokázali několikanásobně vyšší hladiny neutrofilů u ozubených pacientů ve srovnání s pacienty bezzubými (26). Zdá se tedy, že se neutrofilů dostávají do slin převážně sulkání tekutinou a jen v omezené míře tkáňovou penetrací či vyplavení slinou.

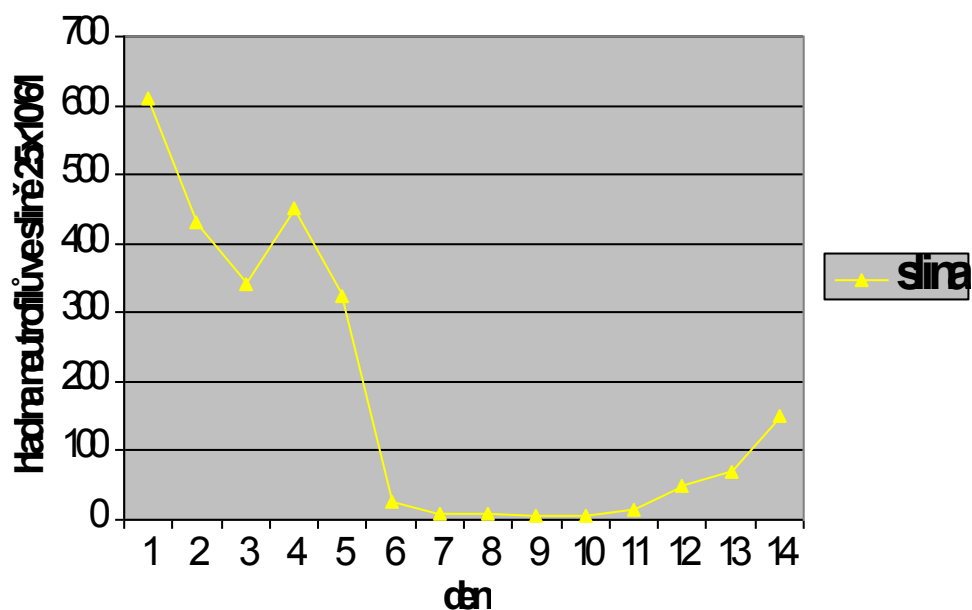
Otázkou zůstává také metodika stanovení fyziologické hladiny neutrofilů ve slině. Wright a spol.⁸⁰ prováděli výplachy dutiny ústní výše popsáním způsobem u několika dobrovolníků s dobrou úrovní orálního zdraví. Hladina neutrofilů ve slině kolísala mezi $1,3 \times 10^5/l$ a $10,8 \times 10^5/l$. V našem souboru 22 dobrovolníků byla průměrná hladina neutrofilů ve slině $174 \times 10^6/l$ (graf. č. 1) a můžeme podotknout, že takovouto variabilitu hladin neutrofilů ve slině jsme nepozorovali. Pro získání srovnatelných výsledků je nutné dodržet časový harmonogram pro odběr vzorků sliny, protože hladina neutrofilů ve slině v průběhu dne kolísá v důsledku konzumace tekutin a potravy.

Souvislost mezi hladinou neutrofilů ve slině a krvi prokazují také stoupající hladiny neutrofilů po podání růstových faktorů. Lieschke a spol.^{81,82,83} prokázali několikanásobné zvýšení hladin neutrofilů ve slině i v krvi u nemocných léčených G-CSF s tím, že hladiny neutrofilů ve slině se zvýšily o několik dnů dříve než v krvi ve srovnání s neléčenými pacienty.

Z výsledků naší studie je zřejmé, že pacienti trpěli v průběhu chemoterapie převážně lehkými orálními mukositidami. Druhý a třetí stupeň orální mukositidy podle NCI-CTC se vyskytoval u pacientů léčených kombinovanou chemoterapií a při nulových hladinách neutrofilů ve slině a krvi. Právě u pacientů léčených kombinovanou chemoterapií pro ne-hodgkinský a Hodgkinův lymfom byla doba trvání orálních mukositid delší. Závažnost slizničního poškození je tedy úměrná toxicitě myeloablativní chemoterapie, jak vyplývá z grafů č. 4 a 5. V této souvislosti můžeme také upozornit na protektivní schopnost neutrofilů, kdy po vzestupu jejich hladin ve slině došlo k rychlému ústupu klinických příznaků orální mukositidy.

Otevřenou kapitolou zůstává radikalita stomatologické přípravy pacientů před transplantací kmenových buněk a chirurgickými výkony. Zdá se, že při plánování této přípravy by měl být zohledněn typ transplantace a agresivita předpokládané chemoterapie. Striktně radikální postup lze doporučit u pacientů před alogenní transplantací. Naše zkušenosti potvrzují názor Starosty a Fabera^{58,60}, že před autologní transplantací kmenových buněk je možno postupovat s menší radikalitou: není tedy nutné extrahovat zuby, byť endodonticky ne zcela dokonale ošetřené, které nemají rentgenologicky prokazatelný periapikální nález. V každém případě je důležité vyloučit rizika mechanické iritace měkkých tkání ostrými hranami zubů, protéz, popřípadě zubním kamenem a předejít tak vzniku slizničních lézí.

Závěry naší práce potvrdily, že počet neutrofilů ve slině může být významně ovlivněn stavem parodontu (graf č. 8).



Graf č. 8

Hladina neutrofilů ve slině u pacientky se zánětlivým onemocněním parodontu. Vysoké vstupní hodnoty neutrofilů ve slině s následným strmým poklesem prokazují velice dobrou odpověď na léčbu Listerinem.

10. Závěr

Sledování hladiny neutrofilů ve slině po autologní transplantaci kostní dřeně se jeví jako praktická metoda s jasnými pozitivy: neinvazivní, jednoduchý odběr biologického materiálu a včasná signalizace úspěšnosti léčby. Výsledkem dobré spolupráce mezi stomatologem a hematologem je nejen snížení frekvence a závažnosti výskytu orálních mukosítid, ale i eliminace rizika potenciálních odontogenních komplikací léčby. Orální zdraví může i v této souvislosti sloužit jako indikátor celkového zdravotního stavu pacienta. Praktické využití stanovení hladiny neutrofilů ve slině jako indikátoru úspěšnosti hematologické léčby může vést i k určité modifikaci léčebného protokolu a nezanedbatelným finančním úsporám. Pro stanovení obecně platných závěrů a doporučení bude nicméně nutné v práci pokračovat a soubor dále rozšířit.

11. Souhrn

Soubor 45 pacientů léčených pro nonhodgkinské a hodgkinské lymfomy, mnohočetné myelomy byl stomatologicky vyšetřen před plánovanou autologní transplantací kmenových buněk. Po sanaci chrupu a odstranění potenciálních ložisek odontogenní fokální infekce byli nemocní v průběhu 3 – 4 týdnů po transplantaci sledováni s ohledem na výskyt orálních mukosítid a stanovení hladiny neutrofilů ve slině jako možných indikátorů úspěšnosti příhojení štěpu. Hladina neutrofilů ve slině byla srovnávána s hladinou neutrofilů v krvi a závažností orální mukosítidy. Zvýšení hladiny neutrofilů ve slině ($25 \times 10^6 / l$ a výše) společně s ústupem klinických symptomů orální mukosítidy signalizovalo příhojení štěpu jeden až dva dny dříve než vzestup hodnot neutrofilů v periferní krvi ($0,5 \times 10^9 / l$ a více). U všech nemocných se v průběhu hematologické léčby manifestovaly orální mukosítidy I. – III. stupně (podle klasifikace NCI - CTC) v závislosti na typu chemoterapie a hladině neutrofilů ve slině. Malá závažnost orálních komplikací hematologické léčby potvrzuje význam pečlivé stomatologické přípravy pacienta před plánovanou autologní transplantací. Sledování hladiny neutrofilů ve slině může být pomocnou metodou běžně užívaných metod hodnocení úspěšnosti autologních transplantací v hematologii.

12. Literatura

1. Schenkels LCPM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit. Rev.Oral.Biol.Med* 1995; 6: 161-167
2. Turner RJ. Mechanisms of fluid secretion by salivary glands. *Ann. NY Acad. Sci* 1993; 694: 24-35
3. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestation and early diagnosis of Sjögren's syndrome. *Arch. Intern. Med.* 2004; 164: 1275-84
4. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Arch. Intern. med.* 1978; 89: 888-92
5. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann. Rheum. Dis* 2006; 65:796-803
6. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R. The European Study Group on classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis* 2002; 61: 554-8
7. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: assessment as a diagnostic tool criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 147-56
8. Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption ionization-time-of-flight-mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1077-86
9. Boyle JO, Mao L, Brennan JA, et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1994; 168: 429-32
10. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. *J Pathol* 2002; 192: 52-7
11. Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, et al. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rince screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005; 117: 605-10
12. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and ris of head and neck cancer 2004; 96: 449-55
13. Negri L, Pacchioni D, Calabrese F, Giacomasso S, MastromatteoV, Fazio M. Serum and salivary CEA and GICA levels in oral cavity tumors. *Int J Biol Markers* 1988; 3: 107-12
14. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, et al. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1998; 18: 4645-9
15. St John M, Li Y, Zhou X et al. IL – 6 and IL8 potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal SCCA. *Arch. Otolaryngol. Head Neck surg.* 2004; 130: 929-935
16. Streckfus CF, Bigler L, Dellinger TD, Dai X, Kingman A, Thigpen JT The presence of c-erbB-2, and CA 15-3 in saliva and serum among women

- with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2363-2370
17. Di-Xia C, Schwartz P, Fan-Qin L Salivary and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 701-704
 18. Wright DG, Meierovics AI, Foxley JM. Assessing the delivery of neutrophils to tissues in neutropenia. *Blood* 1986; 67: 1023-1030
 19. Gorgun A, Knight D.R, Wright G.D. Use of oral mucosal neutrophil counts to detect the onset and resolution of profound neutropenia following high-dose myelosuppressive chemotherapy. *American Journal of Hematology* 2003; 72: 13-19
 20. Cheretakise C, Dror Y, Glogauer M. A non invasive oral rinse assay to monitor engraftment, neutrophil tissue delivery and susceptibility to infection following HSCI in pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 36: 227-232
 21. Lieschke G.J, Ramenghi U, O'Connor MP, Sheridan W, Szer J, Morstyn G. Studies of oral neutrophils levels in patients receiving G-CSF after autologous marrow transplantation. *British Journal of Haematology* 1992; 82: 589-595
 22. Gordis E.B et. al. Asymmetry between salivary cortisol and alpha-amylase reactivity to stress: relation to aggressive behavior in adolescents. *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31: 976-987
 23. Chatterton R.T et. al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity 1996; 16: 433-448
 24. Bosch J.A et. al. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom. Med.* 2003; 65: 245-58
 25. Beckett, A.H., Rowland, M. Urinary excretion kinetics of amphetamine in man. *J.Pharm. Pharmacol.*, 1965; 17: 628-638
 26. Wan, S.H.,Matin, S.B., Azarnoff, D.L., Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1978; 23: 585-590
 27. Inaba, T., Kalow, W., Salivary excretion of amobarbital in man. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1975; 18: 558-562
 28. Di-Gregorio, G.J., Piraino, A.J., Ruch, E., Diazepam concentrations in parotid saliva, mixed saliva and plasma. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1978; 24: 720-725
 29. Huestis, M.A., Cone, E.J., Relationship of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid to plasma after controlled administration of smoked cannabis.*J.Anal.Toxicol.*2004; 28: 394-399
 30. Niedbala, R.S., Kardos, K.W., Salamone, S. et al. Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing, *J.Anal.Toxicol.*, 2004; 28: 546-552
 31. Niedbala, R.S., Kardos, K.W., Fritch, E.F., et al. Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing. II. Two studies of extreme cannabis smoke exposure in a motor vehicle *J.Anal.Toxicol.* 2005; 29: 607-615
 32. Cone, E.J., Oyler, J., Darwin, W.D. Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal, and smoked administration.*J.Anal.Toxicol.* 1997; 21: 465-475
 33. Etzel, R.A. A review OF the use OF saliva conitine as a marker OF tobacco smoke exposure *Prev.Med.*1990; 19: 190-197

34. Rook, E.J., Van Ree, J.M., Van Den, B.W., et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients. *Basic.Clin.Pharmacol.Toxicol.* 2006; 98: 86-96
35. Jenkins, A.J., Oyler, J.M., Cone, E.J. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J.Anal.Toxicol.* 1995; 19: 359-374
36. Cone, E.J., Dickerson, S., Paul, B.D., Mitchell, J.M., Forensic drug testing for opiates V.Urine testing for heroin, morphine, and codeine, with commercial opiate immunoassays. *J.Anal.Toxicol.* 1993; 17: 156-164
37. Cone, E.J., Saliva testing for drug abuse.*Ann. N.Y.Acad.Sci.* 1993; 694: 91-127
38. Jenkins, A.J., Oyler, J.M., Cone, E.J. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentration in blood and plasma *J.Anal.Toxicol,* 1995; 19: 359-374
39. Rohrig , T.P., Moore, C. The determination of morphine in urine and oral fluid following ingestion of poppy seeds *J.Anal.Toxikol.* 2003; 27: 449-452
40. Kim,I., Barnes, A.J., Oyler, J.M. et al. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration *Clin.Chem.* 2000; 48: 1486-1496
41. Eguchi, J.Isihara, K., Watanabe, A., Fukumoto, Y., Okuda, K., PCR method is essential for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in oral cavity samples. *Oral.Microbiol.Immunol.* 2003; 18(3): 156-159
42. Shames, B., Krajdén, S., Fuksa, M.Babida C., Penner, J.L. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J.Clin.Microbiol.,* 1989; 27(12): 2849-2850
43. Tiwari, S.K., Khan, A.A., Ahmed, K.S., et al. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. *Singapore Med.J.* 2005; 46(5): 224-228
44. Granstrom, G., Askelof, P., Granstrom, M., Specific immunoglobulin A to *Bordetella pertussis* antigens in mucosal secretion for rapid diagnosis of whooping cough. *J.Clin.Microbiol.,* 1988; 26(5): 869-874
45. Scully, C. HIV topic update: salivary testing for antibodies, *Oral.Dis.,*1997; 3: 212-215
46. Martinez, P.M.,Torres, A.R., Ortiz de Lejarazu, R., Montoya, A., Martin, J.F., Eiros, J.M., HIV antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival –crevicular transudate, and urine samples. *J.Clin.Microbiol.* 1999; 37: 1100-1106
47. Grant, R.M., Piwowar, E.M., Katongole- Mbidde, E. et al Comparison of saliva and serum for human immunodeficiency virus type 1 antibody testing in Uganda using a rapid recombinant assay. *Clin.Diag.Laboratory Immunol.* 1996; 3: 640-644
48. Luizzi, G., Chirianni A., Clementi, M., Zaccarelli, M., Antinori, A., Piazza, M. Reduction of HIV-1 viral load in saliva by indinavir –containing antiretroviral regimen. 2002; 16(3): 503-504
49. Baron, S., Poast, J., Cloyd, M.W., Why is HIV rarely transmitted by oral secretions? Saliva can disrupt orally shed, infected leukocytes. *Arch.Intern.Med.,* 1999; 159 (3): 303-310

50. Ly, T.D., Ebel, A., Faucher, V., Fihman, V., Laperche, S. Could the new HIV combined p24 antigen and antibody assays replace p24 antigen specific assays? *J.Virol. Methods* 2007; 143(1): 86-94
51. Blackbourn, D.J., Lennette, E.T., Ambroziak, J., Mourich, D.V., Levy J.A. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretion and saliva *J.Infect. Dis.* 1998; 177: 213-216
52. LaDuca, J.R., Love, J.L., Abott, L.Z., Dube, S., Freidman- Kien, A.E., Poiesz, B.J., Detestion OF human herpes virus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J.Infect. Dis.* 1998; 178: 1610-1615
53. Crepin, P., Audry, L., Rotivel, Y., Gacoin, A., Caroff, C., Bourhy, H., Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J.Clin.Microbiol.* 1998; 36: 1117-1121
54. Crowcroft, N.S., Vyse, A., Brown, D.W., Strachan, D.P. Epidemiology of Epstein-Barr virus infection in pre-adolescent children: application of a new salivary method in Edinburgh, Scotland. *J.Epidemiol.Community Health*, 1998; 52: 101-104
55. Blijlevens, N., Donnelly, J.P., De Pau, B.E. Mucosal barrier injury: biology pathology clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant*, 2000; 25: 1269–1278.
56. Thomas, E.D., Lochte, H.J., Cannon, J.H., Sahler, O.D., Ferrebee, J.W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin Invest*, 1950; 38: 1709-1716.
57. Ferrara, J.L.M., Deeg, H.L. Graft-versus-host disease. *Eng J Med.* 1991; 324: 667-674.
58. Starosta, M., Faber, E. Stomatitis u nemocných po autologní transplantaci hemopoetických kmenových buněk. *Praktické zubní lékařství.* 2000; 48: 131-136.
59. Stockman, M.A., Sonis, S.T., Dijkstra, P.U. et al. Assessment of oral mucositis in clinical trials: impact of training on evaluators in multi-centre trial. *Eur.J.Cancer* 2005; 41: 1735-1738.
60. Bartáková V. Problémy stomatologického ošetřování u vybraných skupin rizikových pacientů, *Čs.Stomatologie* 1986; 4: 255-260.
61. Rubenstein E, Peterson D, Schubert M, et al. Clinical practice guidelines for prevention and treatment of cancer therapy – induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 2004; 100: 2026- 2046
62. Barasch, A., Peterson, DE., Tanzer, JM., et al. Helium- neon laser effects on conditioning induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer* 1995; 76: 2550-2556.
63. Cowen, D., Tardieu, C., Schubert, MM., et al. Low energy helium-neon laser in prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplantation- results of double blind randomized trial. *Ind. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997; 38: 367-703.
64. Cascinu, S., Fedeli, A., Fedeli, SL., et al. Oral cooling (cryotherapy), and effective treatment for prevention of 5- fluorouracil induced stomatitis. *Eur.J.Cancer B.Oral Oncology.* 1994 ; 30B: 234-236.
65. Mahood, DJ., Dose, AN., Loprinzi, CL., et al. Inhibition of fluorouracil – induced stomatitis by oral cryotherapy. *J.Clin. Oncol.* 1991; 9: 449-452.

66. Mori, T., Yamazaki, R., Aisa, Y., Nakazato, T., Ikeda, Y., Okamoto, S., Brief oral cryotherapy for the prevention of high-dose melphalan-induced stomatitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer*. 2005; 13: 266-269.
67. Roche, LK., Loprinzi, CL., Lee, JK., et al. A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5- fluorouracil – related stomatitis. *Cancer*. 1993; 72: 2234- 2238.
68. Stone, R., Quinn, B., McCann, S., et al. Improving oral care in transplantation quality control of oral mucositis (OM) assesment in the EBMT prospective oral mucositis audit (POMA). *Bone Marrow Transplantation*. 2006; 37: N966.
69. Fine, D.H. Mouthrines as adjunct for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. 1988; 1:, 259-263.
70. Miler T.F., Silva A., Ferreira S.M., Jabra-rizk M.A., Kelley J.I., Depaola L.G. Efficacy of Listerine antiseptic in reducing viral contamination of saliva. *J. Clin. Periodontol*. 2005; 32: 341-346.
71. Minah, G. E., Depaola, L.G., Overholser, C. D., Miller, T.F., Niehaus, C., Lamm, R.A., Ross, N.M., Dills, S.S. Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. *Journal of Clinical Periodontology* 1989; 15: 347-352.
72. Vokurka, S., Bystřická, E., Koza, V., et al. The comparative effects of providone-iodine and normal saline mouthwashes on oral mucositis in patients after high-dose chemotherapy and APBSCT – results of a randomized multicentre study. *Support Care Cancer* 2002; 13: 554-558.
73. Walker, C., Clark, W., Tyler, K., Ross, N., Dill S. Evaluation of microbial shifts following long-term antiseptic mouthrinse use. *Journal of Periodontology* 1997; 48: 646-649.
74. Wolfgang, J. Köstler, Hejna, M., Catharina, W., Zielinski, C. Oral mucositis complicating chemotherapy and /or radiotherapy: opinions for prevention and treatment. *CA Cancer J Clin*. 2001; 51: 290-315.
75. Sonis, S. The pathology of mucositis. *Nat.Rev.Cancer* 2004; 4: 227-284
76. Sonis, S., Oster, G., Fuchs, H. et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem – cell transplantation. *Oncol* 2001;19: 2201-2205.
77. Spielberger, R., Stiff, P., Bensinger, W., et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351: 2590-2598.
78. Cheratis, C., Dror, Y., Glogauer M. A noninvasive oral rinse assay to monitor engraftment, neutrophil tissue delivery and susceptibility to infection following HSCI in pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 36: 227-232.
79. Gorgun, A., Knight D.R., Wright G.D., Use of oral mucosal neutrophil counts to detect the onset and resolution of profound neutropenia following high-dose myelosuppressive chemotherapy. *American Journal of Hematology*. 2003; 72: 13-19.
80. Wright, DG., Meierovics, AI., Foxley, JM. Assessing the delivery of neutrophils to tissues in neutropenia. *Blood* 1986; 67: 1023-1030.

81. Lieschke, G.J., Ramenghi, U., O'Connor, MP., Sheridan, W., Szer, J., Morstyn, G. Studies of oral neutrophils levels in patients receiving G-CSF after autologous marrow transplantation. *British Journal of Haematology*.1992; 82: 589-595.
82. Krijanovski, O., Hill, G., Cooke, K., et al. Keratinocyte growth factor separates graft- versus- leukemia effects from graft – versus- host-disease. *Blood* 1999; 94: 825- 831
83. Bender, JS., Thang, H., Glogauer, M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J. Periodont.Res.* 2006; 41: 214-220.

13. Poděkování

Závěrem bych chtěl poděkovat mému školiteli profesoru MUDr. Jindřichovi Pazderovi, CSc., přednostovi Kliniky ÚČOCH LF UP a FN v Olomouci za jeho svědomitou a soustavnou metodickou práci a jeho čas, který mi věnoval v průběhu mého postgraduálního studia.

Velký dík patří také docentu MUDr. Edgaru Faberovi, CSc. a MUDr. Janě Vondrákové, kteří se velkou měrou podíleli zvláště na hematologické části odborné práce.

Za pečlivé vyhodnocování vzorků pacientů děkuji i všem laborantkám Hematologické kliniky LF UP a FN v Olomouci.

Z lidského hlediska děkuji také celé své rodině za trpělivost a pochopení.