

## **PRIKUPLJANJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA IZ PERIFERNE KRVI**

### **PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELL COLLECTION**

INES BOJANIĆ, SANJA MAZIĆ, BRANKA GOLUBIĆ ČEPULIĆ\*

**Deskriptori:** Transplantacija krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi; Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica – metode; Stimulirajući čimbenik rasta granulocitnih kolonija; Leukafereza; Antigeni, CD34 – analiza

**Sažetak.** KMS prikupljene iz periferne krvi imaju brojne prednosti pred tradicionalnim izvorom KMS koštanoj srži. Prikupljanje KMS iz periferne krvi postupkom leukafereze na staničnom separatoru je jednostavnije i sigurnije nego prikupljanje koštane srži. KMS se u perifernu krv mobiliziraju mijelosupresivnom kemoterapijom i/ili krvotvornim činiteljima rasta. U produktu leukafereze uz KMS nalaze se i usmjerene mijeloidne prastanice i stanice-preteče pa je hematološki oporavak brži. U bolesnika koji su mobilizirali mali broj stanica može se primijeniti leukafereza velikog volumena krvi (LVV) ili mobilizacijski agensi druge generacije (pegfilgrastim, antagonisti CXCR4-receptora). Standardno se ukupan volumen krvi obrađuje 2 do 3 puta, a kod LVV više od 3 puta. Prinos CD34+ stanica značajno je veći kod LVV. Nuspojave leukafereze su poremećaj elektrolita zbog primjene citrata (hipokalcemija) i povećan rizik od krvarenja zbog trombocitopenije i primjene heparina. Prikupljanje KMS i kontrola kvalitete transplantata KMS iz periferne krvi regulirani su nacionalnim i međunarodnim preporukama i standardima.

**Descriptors:** Peripheral blood stem cell transplantation; Hematopoietic stem cell mobilization – methods; Granulocyte colony-stimulating factor; Leukapheresis; Antigens, CD34 – analysis

**Summary.** Peripheral blood hematopoietic stem cells (PBSC) have numerous advantages in comparison with traditionally used bone marrow. PBSC collection by leukapheresis procedure is simpler and better tolerated than bone marrow harvest. PBSC are mobilized by myelosuppressive chemotherapy or/and hematopoietic growth factors. Leukapheresis product contains PBSC along with lineage committed progenitors and precursors which contribute to faster hematopoietic recovery. In »poor mobilizers« options are large-volume leukapheresis (LVL) procedure or second generation of mobilising agents (pegfilgrastim, CXCR4 receptor antagonists). Total blood volume is processed 2–3 times in standard procedure compared to more than 3 times in LVL. LVL yields significantly higher numbers of CD34+ cells. Adverse effects of leukapheresis are electrolyte disbalance (hypocalcemia) caused by citrat administration and risk of bleeding due to thrombocytopenia and heparin administration. PBSC collection and product quality control are regulated by national and international standards and recommendations.

Liječ Vjesn 2009;131:315–323

Krvotvorna matična stanica (KMS) prva je otkrivena od matičnih stanica ljudskog organizma, do sada je najbolje poznata te jedina od populacija matičnih stanica koja se primjenjuje u svakodnevnom kliničkom radu.<sup>1</sup> Ova zajednička ishodišna stanica ima sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u usmjerene prastanice mijelopoetskog i limfopoetskog sustava iz kojih procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju sve funkcionalno zrele krvne stanice.<sup>2</sup> Iako je KMS primarno smještena u koštanoj srži gdje specifičan hematopoetski induktivni mikrookoliš regulira njezine funkcije,<sup>3</sup> ona ipak pokazuje značajnu pokretljivost. Kao odgovor na specifične signale KMS može izaći iz koštane srži u perifernu krv procesom koji se naziva mobilizacija ili ponovno ući u koštanoj srži procesom udomljavanja.<sup>4</sup> Upravo zbog tih njezinih osobina već više od 25 godina uspješno se transplantira i rabi za liječenje kongenitalnih i stečenih malignih bolesti krvotvornog i imunskog sustava, kao i nekih solidnih tumora. S obzirom na izbor davatelja razlikuje se transplantacija alogenih i autogenih KMS. Alogenom transplantacijom zamjenjuju se manje vrijedne KMS bolesnika zdravim stanicama srodnih ili nesrodnih davatelja. Transplantacija autogenih KMS metoda je liječenja pri kojoj se

bolest eradiciira visokim dozama kemoterapije i/ili zračenja, a pri tome nastalo ireverzibilno oštećenje koštane srži prevladava se infuzijom prethodno prikupljenih i zamrzavanjem očuvanih KMS bolesnika.

Danas se za potrebe transplantacije rabe tri izvora KMS, a to su koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Odluka o odabiru izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti davatelja KMS. Iako se funkcija koštane srži može obnoviti nakon transplantacije KMS iz sva tri izvora, poznato je da postoje brojne kvantitativne i kvalitativne razlike između transplantata prikupljenih iz različitih izvora KMS.<sup>5</sup> Tradicionalni izvor KMS je koštana srž koja danas sve više ustupa mjesto transplantatu prikupljenom iz periferne krvi. Izvješće *European Blood and Marrow Transplantation Group* (EBMT) o transplantaciji KMS u Europi

\* **Zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju, KBC Zagreb** (dr. sc. Ines Bojanić, dr. med.; mr. sc. Sanja Mazić, dr. med.; prim. mr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. I. Bojanić, Zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb; e-mail: ibojanic@kbc-zagreb.hr

Primljeno 22. srpnja 2009., prihvaćeno 16. rujna 2009.

za 2007. godinu pokazalo je da se KMS prikupljene iz periferne krvi primjenjuju u 98% autolognih transplantacija i u 71% alogenih transplantacija. Brojni su razlozi za povećanu primjenu KMS iz periferne krvi. KMS se prikupljaju iz periferne krvi staničnim separatorom postupkom leukafereze koji je jednostavniji i sigurniji nego vađenje koštane srži. Kod bolesnika s koštanom srži zahvaćenom malignim stanicama, kao i s koštanom srži koja je fibrozirala zbog prethodnog zračenja područja zdjelice, prikupljanje KMS iz periferne krvi omogućuje prikupljanje transplantata zadovoljavajuće kvalitete. Prednost prikupljanja KMS iz periferne krvi je i u tome što se broj krvotvornih prastanica u perifernoj krvi može ciljano povećati *in vivo* postupkom mobilizacije primjenom mijelosupresivnih doza kemoterapije i/ili krvotvornih činitelja rasta.<sup>6,7</sup> Budući da se u produktu leukafereze uz KMS nalaze i usmjerene mijeloidne prastanice i stanice-preteče, oporavak funkcija koštane srži je brži nakon transplantacije KMS iz periferne krvi nego nakon transplantacije koštane srži, što je jedan od glavnih razloga da se danas i u slučaju kad je koštana srž bolesnika prihvatljiva za transplantaciju, prednost daje KMS prikupljenim iz periferne krvi.

### Mobilizacija KMS u perifernu krv

KMS se u perifernoj krvi nalaze u značajno manjem broju nego u koštanoj srži.<sup>8</sup> Budući da se u uvjetima homeostaze u krvi nalazi manje od 0,05% CD34+ stanica,<sup>9</sup> pri uporabi periferne krvi kao izvora KMS za prikupljanje dovoljnog broja stanica potrebno je učiniti velik broj postupaka leukafereze ili povećati broj KMS u cirkulaciji. Poticanje izlaska KMS iz koštane srži u cirkulaciju naziva se mobilizacija. Kratkotrajna i prolazna porast broja KMS u krvi javlja se nakon fizičke aktivnosti, stresa izazvanog primjenom adrenokortikotropnog hormona, primjene endotoksina i sintetičkog polianiona dekstran sulfata.<sup>10</sup> Za potrebe transplantacije KMS se mobiliziraju mijelosupresivnom kemoterapijom i krvotvornim činiteljima rasta.

#### Mobilizacija KMS mijelosupresivnom kemoterapijom

O porastu broja KMS u perifernoj krvi 2 do 3 tjedna nakon primjene mijelosupresivne kemoterapije izvješteno je još 1976. godine.<sup>11</sup> Citotoksični lijekovi oštećuju stanice koštane srži, a kao reakcija na oštećenje preostale se KMS umnožavaju da bi obnovile koštano srž. U ranoj fazi oporavka hematopoeze povećava se broj mijeloidnih prastanica i dolazi do izlaska KMS iz koštane srži u krv. Za mobilizaciju KMS rabe se različiti kemoterapijski protokoli ovisno o vrsti i stadiju osnovne bolesti, a najčešće ciklofosamid u dozi od 4 do 7 g/m<sup>2</sup>.

#### Mobilizacija KMS krvotvornim činiteljima rasta

Godine 1988. opaženo je da citokini koji djeluju kao krvotvorni činitelji rasta povećavaju broj KMS u krvi bolesnika s malignim bolestima.<sup>12</sup> Za mobilizaciju se najčešće rabe činitelj stimulacije granulocitnih kolonija (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, *G-CSF*) i činitelj stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, *GM-CSF*). Kod prikupljanja KMS G-CSF se u mobilizaciji pokazao učinkovitijim od GM-CSF-a. Eksperimentalno se za mobilizaciju primjenjuju i drugi citokini: trombopoetin, FLT 3-ligand, SCF (engl. *stem cell factor*), interleukin (IL)-8, IL-7, IL-3 te IL-12.<sup>13</sup>

U kliničkoj se praksi za mobilizaciju najčešće primjenjuje filgrastim (Neupogen®, Amgen Inc, Thousand Oaks, Cali-

fornia, SAD), ljudski G-CSF proizveden rekombinantnom DNA-tehnologijom. Filgrastim proizvodi bakterija *Escherichia coli* u koju je ubačen gen za G-CSF. Njegova sigurnost i učinkovitost potvrđena je tijekom 20 godina primjene. U autolognih davatelja filgrastim se primjenjuje supkutano u dozi od 10 µg/kg/dan tijekom 5 dana sam ili u kombinaciji s mijelosupresivnom kemoterapijom. Porast KMS u perifernoj krvi veći je kada se kemoterapija kombinira s primjenom krvotvornih činitelja rasta.<sup>6</sup> Mobilizacijski protokoli s kemoterapijom i/ili činiteljima rasta povećavaju brojnost i heterogenost stanica te nakon primjene samo jedne metode mobilizacije broj CFU-GM i/ili CD34+ stanica poveća od 10 do 100 puta, a uz sinergistički učinak kombinirane primjene kemoterapije i G-CSF-a od 100 do 500 puta.<sup>14</sup> Krvotvorni činitelji rasta su omogućili mobilizaciju KMS u perifernu krv i kod zdravih davatelja. Filgrastim se u alogenih davatelja najčešće primjenjuje supkutano u dozi od 10 µg/kg/dan tijekom 4 do 5 dana.<sup>15</sup> Dnevna doza filgrastima primijenjena u dvije podijeljene doze rezultira većim prinosom KMS od jednokratne primjene kako u zdravih davatelja tako i u bolesnika.<sup>13</sup>

Tijekom primjene G-CSF-a u čak 80% davatelja javlja se blaga do umjerena bol u kostima, a opisane su i druge nuspojave: glavobolja, slabost, mučnina i povišenje temperature. Ove nuspojave ublažava peroralna primjena analgetika, obično paracetamola, a nestaju jedan do dva dana nakon posljednje injekcije G-CSF-a. Kod gotovo svih davatelja tijekom mobilizacije G-CSF-om dolazi do povećanja slezene. Sporadični slučajevi rupture povećane slezene opisani su i u bolesnika i u zdravih davatelja pa se u njih preporučuje ultrazvučno praćenje veličine slezene.<sup>16</sup> Dugotrajni učinak G-CSF-a na zdrave davatelje još nije u cijelosti poznat. Prema do sada dostupnim podacima, u zdravih davatelja koji su prije 1 do 9 godina primali G-CSF za mobilizaciju KMS nije opažen povećani rizik od nastanka leukemije.<sup>17-19</sup>

#### Mehanizam mobilizacije KMS

Sudbina KMS većinom je regulirana djelovanjem njezina neposrednog mikrookoliša. Agensi koji se zadnjih dvadesetak godina rabe za mobilizaciju KMS aktiviraju mijeloidne stanice na otpuštanje proteaza.<sup>15</sup> Oni direktno ili indirektno uzrokuju ekspanziju, aktivaciju i degradaciju mijeloidnih stanica unutar koštane srži, a to dovodi do otpuštanja enzima elastaze, katepsina G i matriksne metaloproteinaze 9 iz neutrofilnih granula. Ove proteaze naizmjenično cijepaju i inaktiviraju kemokin CXCL12, njegov receptor CXCR4 i adhezijsku molekulu VCAM-1 te zato KMS mogu izaći iz koštane srži. Filgrastim stimulira ekspanziju i aktivaciju mijeloidnih i granulocitnih prastanica u koštanoj srži. Nakon nekoliko dana primjene povećava se broj zrelih granulocita u perifernoj krvi koji otpuštaju velik broj aktivnih neutrofilnih serinskih proteaza i uzrokuju mobilizaciju KMS. Primjena G-CSF ili kemoterapije smanjuje aktivnost inhibitora serinskih proteaza, npr.  $\alpha$  1-antitripsina (serpina 1), koji bi inače blokirali proteolitičku aktivnost elastaze i katepsina G otpuštenih iz neutrofila. Smanjena aktivnost inhibitora proteaza omogućuje nakupljanje ovih dviju serinskih proteaza u koštanoj srži u njihovu aktivnom obliku.

#### Činitelji koji utječu na uspjeh mobilizacije KMS

Mobilizacija KMS nije jednako uspješna kod svih osoba. Unatoč brojnim mobilizacijskim protokolima još uvijek u jednog dijela bolesnika nije moguće prikupiti dovoljan broj KMS. Bolesnici se smatraju »lošim« mobilizatorima ako je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi manji od  $20 \times 10^6/L$  ili

je broj prikupljenih CD34+ stanica manji od  $2 \times 10^8/\text{kg TT}$ .<sup>14</sup> Kod kombinirane primjene kemoterapije i G-CSF-a 20 do 40% bolesnika su »loši« mobilizatori. Valja istaknuti da se i kod 5 do 10% zdravih davatelja ne uspije mobilizirati dovoljan broj CD34+ stanica. Kod zdravih davatelja su muški spol i mlada životna dob povezani s većim prinosom CD34+ stanica.<sup>9</sup> U autolognoj transplantaciji na uspjeh mobilizacije utječu dijagnoza i stanje bolesti te vrsta i intenzitet liječenja koji su primijenjeni prije mobilizacije. Varijabilnost odgovora na primjenu mobilizacijskih agenasa vjerojatno je posljedica slabije aktivacije granulocita, manje količine proteaza, smanjenog broj KMS u koštanoj srži, kao i suboptimalnoga hematopoetskog mikrookoliša. Loša mobilizacija KMS opisana je u 17 do 81% bolesnika s akutnom mijeloidnom leukemijom.<sup>9</sup> Najvažniji prognostički činitelji za lošu mobilizaciju su broj prethodnih ciklusa kemoterapije, izloženost mijelotoksičnim lijekovima kao što su karmustin i melfalan te prethodno zračenje.<sup>9</sup> Kod bolesnika koji su prethodno primili velik broj (>6) ciklusa kemoterapije dolazi do kumulativnog oštećenja hematopoeze. Stoga prikupljanje KMS treba razmotriti u ranoj fazi liječenja prije nego što nastane oštećenje koštane srži. Prevladavanje problema »loših« mobilizatora izuzetno je važno i s ekonomskog gledišta jer su kod njih veći troškovi poslijetransplantacijske potpore. Pod time se razumijeva značajno duži boravak u bolnici, kao i eventualna potreba za dodatnim prikupljanjem koštane srži.

#### Mogućnosti za poboljšanje mobilizacije KMS

U bolesnika koji su u perifernu krv mobilizirali malen broj stanica mogu se primijeniti sljedeći postupci: 1. ponovljena mobilizacija istim ili intenzivnijim protokolom, 2. leukafereza velikog volumena krvi i 3. novi mobilizacijski agensi.<sup>9</sup>

Najjednostavnije je ponoviti mobilizaciju KMS G-CSF-om, prikupiti maksimalni mogući broj CD34+ stanica te bolesnika transplantirati produktima leukafereze prikupljenim tijekom obiju mobilizacija. Remobilizacija može biti uspješna u određenoj skupini bolesnika, ali je praćena dodatnim troškovima i morbiditetom. Analiza prikupljanja autolognih KMS u 269 bolesnika kod kojih se tijekom prve mobilizacije nije prikupio dovoljan broj CD34+ stanica pokazala je da je čak u 81,6% bolesnika i druga mobilizacija bila neuspješna. Kada su spojeni produkti prikupljeni tijekom objiju mobilizacija, 28,1% bolesnika još uvijek nije imalo transplantat.<sup>15</sup> Stoga se danas razmatra primjena druge generacije mobilizacijskih agenasa kao što su modificirani oblik G-CSF-a, antagonisti CXCR4 koji su usmjereni direktno na KMS te agensi koji povećanjem broja osteoblasta povećavaju i ukupan broj KMS u koštanoj srži.

*Modificirani oblik G-CSF* ima bolju bioraspoloživost i pridonosi davateljevoj udobnosti. Rekombinantni G-CSF koji proizvode bakterije jest neglikolizirani protein koji se relativno brzo uklanja iz plazme pa ga je potrebno primjenjivati dnevno u obliku injekcija. Da bi se usporilo njegovo uklanjanje iz plazme i povećala bioraspoloživost, rekombinantni G-CSF je pegiliran, tj. kemijski konjugiran s polietilen glikolom. Pegiliranjem filgrastima nastaje veća molekula od približno 39 kDa s poluzivotom od oko 33 sata. Pegfilgrastim je pegilirani G-CSF (Neulasta®; Amgen Inc, Thousand Oaks, California, SAD) koji se primjenjuje u jednoj injekciji od 12 mg.<sup>20</sup> Istraživanja provedena na zdravim dobrovoljcima pokazala su da je jedna injekcija pegfilgrastima učinkovita u stimulaciji mobilizacije KMS. Stoviše, maksimalni broj KMS u perifernoj krvi je i 3 puta veći nego

nakon dnevne primjene filgrastima, a i maksimalni se broj CD34+ stanica javlja jedan do dva dana ranije nego nakon dnevne primjene.

*Antagonisti CXCR4-receptora* novost su među mobilizacijskim agensima jer je njihovo djelovanje usmjereno direktno na samu KMS. Kemokinski receptor CXCR4 idealna je meta za direktnu mobilizaciju KMS, budući da je izražen na svim krvotvornim prekursorima i nužno je potreban za zadržavanje KMS u koštanoj srži. Od svih do sada identificiranih antagonista CXCR4-receptora, spoj AMD3100 (pleriksafor) jedini je već u kliničkoj primjeni.<sup>15,21</sup> Interakcija između CXCL12 i CXCR4 regulira udomljavanje i migraciju matičnih stanica, a AMD3100 reverzibilno inhibira vezanje CXCR4 s njegovim ligandom CXCL12 što uzrokuje mobilizaciju CD34+ stanice u perifernu krv. Primijenjen kao jedna supkutana injekcija, maksimalnu koncentraciju u plazmi doseže već za 30 do 60 minuta, dok mu je poluzivot 3 sata. Prikupljanje CD34+ stanica jednako je učinkovito nakon mobilizacije jednom dozom AMD3100 (240 µg/kg), kao i nakon 5 dana primjene G-CSF-a. AMD3100 snažno sinergistički djeluje s G-CSF-om i primijenjen peti dan stimulacije G-CSF-om značajno povećava broj CD34+ stanica. Zanimljivo je da CD34+ stanice mobilizirane istodobnom primjenom G-CSF-a i AMD3100 u usporedbi s CD34+ stanicama mobiliziranim samo G-CSF-om pojačano izražavaju gene koji stanicu štite od apoptoze, reguliraju stanični ciklus, oštećenje DNA i transport kisika.<sup>22</sup>

*Mobilizacijski agensi koji stimuliraju stvaranje kosti* mogu povećati broj KMS u koštanoj srži i time pridonose mobilizaciji većeg broja KMS u perifernu krv, što potvrđuju istraživanja provedena u laboratorijskih životinja.<sup>15, 23</sup> Svakodnevna primjena paratiroidnog hormona (PTH) u miševa tijekom 5 tjedana povećala je aktivnost osteoblasta, stvaranje kosti i udvostručila je broj KMS mobiliziranih G-CSF-om.<sup>24</sup> Prva faza kliničkog ispitivanja PTH provedena je kod 20 bolesnika koji su prethodno primili velik broj ciklusa kemoterapije i koji su loše odgovorili na mobilizaciju G-CSF-om. Nakon 14 dana primjene PTH 40% bolesnika mobiliziralo je zadovoljavajući broj CD34+ stanica uz primjenu samo G-CSF-a.<sup>25</sup> Ovi rezultati upućuju na to da primjena agenasa koji povećavaju stvaranje kosti može zaštititi KMS od štetnog učinka uzastopnih ciklusa mijelosupresivne kemoterapije te obnoviti učinkovitost mobilizacije u autolognih davatelja.

#### Prikupljanje KMS iz periferne krvi postupkom leukafereze

KMS se iz periferne krvi prikupljaju staničnim separatorom postupkom leukafereze. Nakon svake leukafereze određuje se prikupljen broj CD34+ stanica i leukafereza se nastavlja sljedećih dana dok se ne skupi ciljni broj stanica. Koliki će broj leukafereza biti potreban za prikupljanje ciljnog broja stanica ovisi o stupnju mobilizacije KMS u perifernu krv, pravodobnom početku prikupljanja, kao i tehnici prikupljanja. Primjena učinkovite tehnike prikupljanja je važna jer utječe direktno na sveukupni broj CD34+ stanica u produktu, a time smanjuje broj potrebnih leukafereza, razdoblje primjene citokina i troškove prikupljanja.

#### Početak prikupljanja KMS

Do povećanja broja KMS u perifernoj krvi ne dolazi uvijek u isto vrijeme jer osobe različito reagiraju na mobilizaciju zbog učinka dobi, dijagnoze te vrste i trajanja prethodnog liječenja. Za odabir optimalnog vremena za počeo

tak prikupljanja nakon mobilizacije kemoterapijom i G-CSF-om u perifernoj se krvi prati broj leukocita i CD34+ stanica. Između broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukafereze i broja prikupljenih CD34+ stanica dokazana je dobra korelacija. Kad je u krvi broj leukocita veći od  $1 \times 10^9/L$ , treba odrediti i broj CD34+ stanica. Brojna su se istraživanja bavila pitanjem koji je najmanji broj CD34+ stanica u perifernoj krvi kada ima smisla započeti leukaferezu.<sup>26</sup> Danas se smatra da je najbolje započeti leukaferezu kada je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi veći od  $10 \times 10^6/L$ .<sup>14</sup> Fabritiis i sur.<sup>26</sup> pokazali su da u bolesnika koji u krvi imaju  $\geq 20 \times 10^6/L$  CD34+ stanica postoji značajna vjerojatnost da se jednim postupkom skupi ciljni broj CD34+ stanica, dok oni s  $< 20 \times 10^6/L$  CD34+ stanica trebaju za to više od jedne leukafereze.

### Stanični separatori

Stanični separatori koji se rabe za prikupljanje krvnih sastojaka kao što su trombociti, eritrociti i plazma mogu se rabiti i za prikupljanje KMS. Ovisno o vrsti stanica koje se žele prikupiti rabe se različiti kompjutorski programi koji nadziru rad separatora. Na tržištu se trenutačno nalazi nekoliko staničnih separatora različitih proizvođača koji se međusobno razlikuju po stupnju automatizacije, volumenu krvi koji se nalazi izvantjelesno u staničnom separatoru, učinkovitosti prikupljanja te gubitku eritrocita i trombocita tijekom prikupljanja. Stanični separatori izdvajaju ciljne skupine stanica raslojenih centrifugiranjem krvi.<sup>14</sup> Puna se krv tijekom diferencijalnog centrifugiranja raslojava u slojeve s obzirom na specifičnu gustoću krvnih sastojaka: eritrocite, granulocite, limfocite i monocite, trombocite te plazmu. Budući da se CD34+ stanice, koje veličinom odgovaraju manjim limfocitima, nalaze u frakciji limfocita i monocita, postupkom leukafereze se iz periferne krvi izdvajaju mononuklearne stanice, dok se ostale krvne stanice vraćaju bolesniku. Kako slojevi stanica nisu oštro razgraničeni, tijekom leukafereze se prikuplja i dio stanica s obje strane sloja mononuklearnih stanica. Hematokrit produkta se tijekom leukafereze održava u rasponu od 2 do 3%. Prikupljanje veće količine eritrocita tijekom leukafereze nije poželjno jer može u davatelja izazvati anemiju. Previše eritrocita u produktu leukafereze može tijekom reinfuzije transplantata u primatelja izazvati nuspojave. Budući da eritrociti nakon odmrzavanja hemoliziraju i oslobađaju slobodni hemoglobin u transplantat, infuzija veće količine slobodnog hemoglobina u primatelja može oštetiti funkciju bubrega. Tijekom leukafereze se uz mononuklearne stanice prikupljaju i trombociti. Važno je prikupiti što manje trombocita jer se na taj način u davatelja izbjegava nastanak trombocitopenije, kao i stvaranje ugrušaka u produktu leukafereze zbog prevelikog broja trombocita.

### Venski pristup

Postupak leukafereze zahtijeva kontinuiran protok krvi kroz stanični separator od 50 do 100 mL/min. Ovakav protok krvi može se postići kroz periferne vene kubitalne regije ako su dovoljno široke za igle promjera 16 do 18 gaugea za uzimanje i najmanje 19 gaugea za vraćanje krvi. Preporuka je da se kada je moguće rabe periferne vene. Više od 60% bolesnika kod kojih se planira postupak leukafereze nema adekvatne periferne vene kojima bi bilo moguće ostvariti zadovoljavajući protok za pumpe staničnog separatora.<sup>27</sup> Oko 10% zdravih davatelja alogenijskih KMS zbog neadekvatnih perifernih vena također zahtijeva postavljanje centralnoga venskoga katetera.<sup>28</sup> Centralni venski kateteri su jedino

praktično rješenje za bolesnike s neodgovarajućim perifernim venama i najčešće se rabe posebni kateteri namijenjeni za hemodijalizu i aferezu. Kateteri za aferezu mogu biti jednoluminalni ili dvoluminalni. Oni omogućuju veći protok krvi jer imaju velik lumen veličine 12 Fr i debele čvrste stijenke kako ih negativni tlak koji stvara stanični separator tijekom uzimanja krvi ne bi slijepio. Čvrsta stijenka im je izrađena od poliuretana ili silikonske gume. Poliuretanski kateteri čvršći su i namijenjeni za primjenu u kraćem razdoblju do 3 tjedna iako se u pravilu vade već nakon završetka prikupljanja.<sup>29</sup> Kateteri proizvedeni od silikonske gume, budući da se mogu sigurno ostaviti na mjestu u dužem razdoblju, postavljaju se u slučajevima kad se isti kateter želi iskoristiti i za postupak prikupljanja KMS i tijekom transplantacije. Kateteri se mogu postaviti u venu supklaviju, unutarnju jugularnu ili pak u femoralnu venu. Svaki od navedenih položaja ima prednosti i nedostatke. Tako je primjerice prednost femoralnog katetera što se može brzo postaviti i ne zahtijeva radiološku kontrolu položaja. Njegovo postavljanje prati manji broj nuspojava, ali nedostaci su veći rizik od infekcije i ograničena pokretljivost bolesnika. Vena supklavija i unutarnja jugularna vena pogodna su za kateter za aferezu, iako tijekom postavljanja može nastati pneumotoraks ili hematotoraks. Prohodnost katetera se između postupaka leukafereze održava ispiranjem i konzerviranjem katetera otopinom heparina.<sup>28</sup>

### Sprječavanje zgrušavanja tijekom leukafereze

Budući da je krv u staničnom separatoru izložena neendotelnim površinama, tijekom leukafereze dolazi do aktivacije sustava zgrušavanja krvi. Sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom leukafereze važno je kako radi osiguranja sigurnosti davatelja tako i zbog kvalitete koncentrata KMS. Za sprječavanje zgrušavanja najčešće se rabi otopina citrata koji stvara nedisocirane komplekse kalcijeva citrata i inhibira agregaciju trombocita. ACD-A (engl. *Acid Citrate Dextrose Formula-A*) je sterilna je otopina limunske kiseline, natrijeva citrata i dekstroze. Tijekom prikupljanja, puna krv se pumpa u stanični separator uz ulazni protok od 50 do 100 mL/min i miješa se s ACD-om, najčešće u omjeru 12:1. Nedovoljna ili netočna primjena antikoagulansa tijekom postupka može aktivirati koagulaciju i uzrokovati pojavu ugrušaka tijekom postupka, i to kako u staničnom separatoru tako i u prikupljenom produktu. S druge strane, suvišak citrata u krvi bolesnika može uzrokovati simptome hipokalcemije zbog sniženja razine ioniziranog kalcija.

### Volumen obrađene krvi i trajanje leukafereze

Danas postoje velike razlike među transplantacijskim centrima s obzirom na volumen obrađene krvi i trajanje postupka leukafereze. Standardno se ukupan volumen krvi obrađuje 2 do 3 puta, što iznosi od 8 do 12 L krvi, a postupak je ograničen na fiksno razdoblje od 3 ili 4 sata.<sup>30</sup> Leukaferezom velikog volumena krvi (LVV, engl. *large volume leukapheresis*) ukupan volumen krvi obradi se više od 3 puta, pa čak do 6 puta.<sup>31,32</sup> Obrada većeg volumena krvi u jednom postupku leukafereze može se postići na dva načina: produženjem trajanja postupka leukafereze ili pak povećanjem brzine ulaznog protoka krvi u stanični separator. Pri produženju leukafereze u obzir valja uzeti koliko je davatelj sposoban podnijeti dugotrajan postupak leukafereze. Tehničko unapređenje staničnih separatora omogućilo je povećanje brzine ulaznog protoka krvi, a time i obradu većeg volumena krvi davatelja u kraćem razdoblju. Radi sprječavanja zgrušavanja tijekom leukafereze obrađenoj se krvi

mora u odgovarajućem omjeru dodati antikoagulantna otopina ACD. Povećanje protoka krvi kroz stanični separator i obrada većeg volumena zahtijevaju primjenu i proporcionalno većeg volumena antikoagulantne otopine, što povećava rizik od nastanka hipokalcemije. Volumen antikoagulansa potreban za sprječavanje zgrušavanja tijekom LVV može se smanjiti ako se uz ACD primijeni i heparin.<sup>33-35</sup> Heparin je siguran antikoagulant koji se već niz godina rabi kao sredstvo za sprječavanje zgrušavanja u aparatima za izvantjelesnu cirkulaciju. Dodavanje heparina u otopinu ACD u omjeru 6 i.j. heparina na 1 mL ACD-A, omogućuje povećanje omjera ACD i pune krvi sa standardnih 1:12 na 1:24 i dvostruko povećanje brzine ulaznog protoka krvi. Udvostručenje brzine ulaznog protoka krvi u separator omogućuje obradu dvostruko većeg volumena krvi u istom razdoblju. Heparin je potrebno također dodati u vrećicu s produktom leukafereze.

Povećanje volumena obrađene krvi jedan je od načina za povećanje prinosa KMS. Važan razlog za obradu što većeg volumena krvi u jednoj leukaferezi je taj što je učinak mobilizacije prolazan i CD34+ stanice se u krvi nalaze u većem broju samo kratko vrijeme. Stoga se to vrijeme mora maksimalno iskoristiti jer se inače može propustiti optimalno vrijeme za prikupljanje. Istraživanja koja su uspoređivala rezultate obrade standardnog volumena u odnosu na veliki volumen krvi pokazala su da je prinos CD34+ stanica značajno veći kod primjene LVV nego kod standardne leukafereze.<sup>34,36,37</sup> Učinkovitost prikupljanja CD34+ stanica ne smanjuje se tijekom LVV.<sup>31,32,38-41</sup> Murea i sur. pokazali su da jedan postupak LVV omogućuje prikupljanje više od 2,5×10<sup>6</sup>/kg CD34+ stanica u 74% bolesnika. Kad se učini standardna leukafereza, tek se u 25% bolesnika skupi toliki broj stanica.<sup>33</sup> Istraživanja koja su pratila dinamiku promjene broja CD34+ stanica u perifernoj krvi pokazala su da tijekom leukafereze dolazi do značajnog smanjenja broja CD34+ stanica u perifernoj krvi na 41% od početne vrijednosti.<sup>42</sup> Tijekom leukafereze dolazi do većeg prinosa CD34+ stanica nego što se može očekivati s obzirom na broj prisutan u krvi prije početka leukafereze.<sup>43, 44</sup> Veći prinos KMS od očekivanoga objašnjen je dodatnom mobilizacijom KMS iz koštane srži tijekom afereze. Unatoč tomu što je broj CD34+ stanica u krvi najvažniji prognostički činitelj uspješnosti prikupljanja, i volumen krvi obrađen tijekom postupka pokazao se vrlo važnim za ukupan prinos leukafereze. Budući da postupak LVV omogućuje prikupljanje većeg broja CD34+ stanica nego standardna leukafereza, što pokazuju rezultati do sada provedenih istraživanja,<sup>33,34,36,45</sup> postupak LVV treba razmotriti kao metodu izbora u loših mobilizatora, jer se manji broj CD34+ stanica u krvi može djelomično kompenzirati produženjem trajanja postupka i povećanjem volumena obrađene krvi.<sup>46</sup> Kod bolesnika s multiplim mijelomom kod kojih treba prikupiti dovoljan broj KMS za dvije transplantacije također se preporučuje LVV.<sup>47</sup> Učinkovito i sigurno prikupljanje KMS postupkom LVV pridonosi udobnosti bolesnika, smanjuje nepotrebno izlaganje rizicima višekratnih leukafereza te smanjuje ekonomske troškove prikupljanja KMS, kao i troškove poslije-transplantacijske skrbi.

#### *Prikupljanje KMS iz periferne krvi u djece*

U djece se postupkom leukafereze mogu uspješno prikupiti KMS, ali pri tome valja obratiti pozornost na mogućnost pojave teškoća uzrokovanih pronalaženjem odgovarajućega venskog pristupa, hemodinamskim poremećajem zbog velikog volumena krvi djeteta u izvantjelesnoj cirkulaciji, me-

taboličkim promjenama uzrokovanim antikoagulantnom otopinom i suradnjom djeteta tijekom postupka koji traje više sati.<sup>48</sup>

Budući da su u djece krvne žile manjeg promjera, ovisno o veličini djeteta moraju se rabiti i različite vrste centralnih venskih katetera. Ako zbog veličine djeteta nije moguće postaviti dvoluminalni, tada jednoluminalne katetere odgovarajućeg promjera treba postaviti u dvije različite vene: npr. jedan u venu supklaviju, a drugi u femoralnu venu.

Jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika za leukaferezu u djece je njihov mali ukupan volumen krvi.<sup>48</sup> Ovisno o vrsti staničnog separatora, u izvantjelesnoj cirkulaciji se tijekom leukafereze nalazi od 180 do 370 ml krvi bolesnika, a to može iznositi čak i do 40% ukupnog volumena krvi djeteta. Pomak bolesnikove krvi u izvantjelesnu cirkulaciju veći od 10 do 15% ukupnog volumena krvi uzrokuje hipovolemiju, hemodiluciju i hemodinamske promjene koje se mogu očitovati bljedoćom i znojenjem, hipotenzijom, tahikardijom pa čak i hipovolemičkim šokom. Hipovolemija i hemodilucija u djece mogu se spriječiti ako se set za prikupljanje staničnog separatora prije početka leukafereze ispuni imunohematološki podudarnim ozračnim koncentratom eritrocita sa smanjenim brojem leukocita. Ovaj je postupak obavezan u sve djece tjelesne težine manje od 25 kg, a neki ga autori preporučuju uvijek kada je volumen krvi u izvantjelesnoj cirkulaciji veći od 15%.<sup>48</sup>

Metaboličke promjene uzrokovane infuzijom citrata u djece su obično izraženije nego u odraslih jer djeca imaju manji kapacitet metaboliziranja citrata u jetri pa se mogu češće javiti simptomi hipokalcemije. Blaži klinički simptomi hipokalcemije u djece su nespecifični i često se prepoznaju tek kada dođe do pogoršanja. Primjena citrata kao antikoagulansa u djece zahtijeva osobito pažljiv nadzor tijekom leukafereze kako bi se na vrijeme prepoznali već i nespecifični simptomi kao što su bol u trbuhu i znojenje ili pak teži, kao što su poremećaj srčanog ritma ili hipotenzija.<sup>48</sup> Stoga je u djece tijekom leukafereze obavezna profilaktička primjena kontinuirane infuzije kalcija.<sup>49</sup> Iako se zbog svega navedenoga u djece može očekivati veći broj neželjenih reakcija nego u odraslih, većina njih se može spriječiti individualnim prilagođavanjem tehnike prikupljanja svakom djetetu.

#### **Sigurnost prikupljanja KMS iz periferne krvi**

Iako je prikupljanje KMS iz periferne krvi siguran postupak, ipak se može očekivati pojava neželjenih reakcija, od poremećaja elektrolita zbog primjene citrata pa do povećanog rizika od krvarenja zbog smanjenja broja trombocita i primjene heparina.

#### *Nuspojave primjene citrata*

Iako se tijekom leukafereze davatelju vraća citrirana krv, citrat ne uzrokuje sistemsko sprječavanje zgrušavanja jer se metabolizira i redistribuira u cirkulaciji. Citrat veže ionizirani kalcij, što uzrokuje prolazno sniženje vrijednosti ioniziranog kalcija u krvi. Hipokalcemija je dobro poznata nuspojava infuzije citrata i javlja se u 39<sup>30</sup> do 48% bolesnika.<sup>50, 51</sup> Pojava simptoma hipokalcemije proporcionalna je s količinom infundiranog ACD-a.<sup>52</sup> Simptomi toksičnosti citrata su parestezije, glavobolja, mučnina i obično imaju maleno kliničko značenje, ali ponekad mogu izazvati i značajan morbiditet. U djece se toksičnost citrata može, osim parestezijama i mučninom, očitovati nemirom, tahikardijom i hipotenzijom. Kod pojave simptoma hipokalcemije može se

smanjiti brzina protoka krvi kroz stanični separator i/ili intravenski primijeniti kalcij.<sup>51</sup> Kalcij glukonat se primjenjuje jako sporo u dozi od 5 mL tijekom 5 do 10 min. Ako simptomi hipokalcemije i nakon toga ustraju, potrebno je dodati još 5 mL kalcij glukonata do ukupno 20 mL.

Danas se smatra da zbog velike učestalosti pojavu simptoma hipokalcemije treba spriječiti profilaktičkom primjenom kalcija. Većina centara primjenjuje profilaktičku infuziju kalcija koja prema rezultatima istraživanja smanjuje incidenciju simptoma hipokalcemije od 65 do 90%.<sup>50</sup> Profilaktička infuzija kalcija može se primijeniti ili u fiksnoj dozi od 1,1 mg/kg/sat ili u dozi prilagođenoj volumenu infundiranog citrata, što iznosi 0,5 mg kalcija/mL ACD-A antikoagulantne otopine. Za djecu se profilaktički primjenjuju više doze kalcija nego u odraslih (0,6 mg kalcija/mL ACD-A).<sup>53</sup> Kod bolesnica s volumenom krvi manjim od 4500 mL obavezna je profilaktička primjena kalcija jer je kod njih i najveća učestalost simptoma hipokalcemije.<sup>50,54</sup>

Tijekom leukaferoze opažene su i promjene drugih elektrolita, osobito magnezija i kalija. Sniženje vrijednosti ioniziranog magnezija tijekom leukaferoze posljedica je stvaranja kompleksa magnezij-citrat.<sup>50,55</sup> Haddad i sur. su kod 30 zdravih davatelja proveli dvostruko slijepo istraživanje učinka kontinuirane infuzije magnezija.<sup>56</sup> Svi su davatelji primili kontinuiranu infuziju kalcija. Polovica davatelja je uz kalcij intravenski primila i magnezij (0,2 mg magnezija/mL ACD-A), a druga placebo. Vrijednosti magnezija u serumu su uz nadoknadu magnezija ostale unutar referentnog intervala. Međutim iv. primjena magnezija uz kontinuiranu infuziju kalcija nije smanjila ni učestalost ni težinu nuspojava u odnosu na skupinu koja je primala samo nadoknadu kalcija. Stoga se smatra da tijekom leukaferoze nije potrebno rutinski primijeniti infuziju magnezija.

Nakon leukaferoze dolazi do značajnog smanjenja vrijednosti kalija.<sup>56</sup> Akutna hipokalemija je obično posljedica pomaka kalija iz ekstracelularne u intracelularnu tekućinu, a jedan od činitelja koji uzrokuje taj pomak je alkalozia. Tijekom leukaferoze dolazi do značajnog porasta pH krvi i suviška baza, što objašnjava popratno sniženje vrijednosti kalija.<sup>56</sup> Porast pH značajno korelira s količinom infundiranog ACD-A. Smatra se da je tijekom leukaferoze peroralna nadoknada kalija dovoljna za korekciju hipokalemije i treba ju primijeniti u bolesnika koji prije leukaferoze imaju niže vrijednosti kalija.

#### *Nuspojave postupka leukaferoze*

Stanični separator uz mononuklearne stanice uvijek prikuplja i dio stanica iz sloja trombocita pa tijekom leukaferoze dolazi do smanjenja broja trombocita. Ovisno o volumenu obrađene krvi broj trombocita se nakon leukaferoze obično smanjuje za 40 do 50%.<sup>52,56</sup> Minimalni broj trombocita prije započinjanja leukaferoze za bolesnike iznosi  $30 \times 10^9/L$ , a za zdrave davatelje  $80 \times 10^9/L$ .<sup>57</sup> Ako je broj trombocita manji od prihvatljivoga, bolesnik treba primiti transfuziju trombocita sa smanjenim brojem leukocita. Trombociti moraju biti ozračeni radi sprječavanja reakcije transplantata protiv primatelja izazvane transfuzijom.<sup>58</sup> U slučaju zdravog davatelja leukaferozu treba nastaviti tek nakon oporavka broja trombocita. Kod LVV se mora uzeti u obzir povećan rizik od krvarenja zbog primjene dvaju antikoagulanasa.<sup>42</sup> Tijekom leukaferoze ne očekuje se značajan gubitak eritrocita. Izuzetno rijetko može nastati gubitak eritrocita kad se na kraju postupka zbog tehničkih problema sa staničnim separatorom ne može isprati i vratiti krv iz separatora.

Na početku leukaferoze kod većine bolesnika, a osobito kod onih manje tjelesne težine, dolazi do smanjenja tjelesne temperature zbog hlađenja krvi tijekom prolaska kroz cijevi staničnog separatora i infuzije otopina koje su sobne temperature. Hipotermija se može spriječiti primjenom grijača za krv. Zamijećeno je da se primjenom grijača za krv može smanjiti i učestalost simptoma hipokalcemije. Klinička i laboratorijska istraživanja su pokazala da hipotermija uzrokuje više metaboličkih poremećaja, a između ostalog i smanjuje razgradnju citrata te na taj način pridonosi štetnom učinku hipokalcemije.<sup>59</sup> Stoga je moguće da se grijanjem krvi i smanjenjem rizika od nastanka hipotermije smanjuje i rizik od pojave simptoma hipokalcemije posebice u bolesnika manje tjelesne težine.

Tijekom leukaferoze mogu se javiti i neke druge nuspojave kao što su vazovagalne reakcije, bljedilo, dijaforeza, sinkopa i hipotenzija. Nuspojave venepunkcije su hematoma, upala, ozljeda živca i punkcija arterije na mjestu uboda. Izuzetno rijetka komplikacija leukaferoze je hemoliza koja se javlja zbog presavijanja cijevi seta kada na tom mjestu dolazi do mehaničke lize eritrocita. Iako teoretski postoji mogućnost nastanka i zračne embolije, stanični separatori su danas opremljeni alarmima koji otkrivaju zrak u cijevi kojom se krv vraća bolesniku i odmah zaustavljaju leukaferozu. U literaturi nema izvješća o slučajevima zračne embolije zbog leukaferoze.

#### **Kontrola kvalitete transplantata KMS iz periferne krvi**

Neposredni ciljevi transplantacije KMS su potpuna obnova matičnih stanica u koštanoj srži te najbrži mogući hematološki oporavak neutrofila i trombocita uz što manji broj nuspojava i troškova liječenja koji prate citopenije. Ti se ciljevi mogu postići samo primjenom transplantata koji sadržava dovoljan broj KMS. U produktu leukaferoze se uz mali broj (6%) »ranih« tj. neusmjerenih matičnih stanica nalazi heterogena mješavina ranih i kasnih usmjerenih prastanica koje su odgovorne za brzi oporavak hematopoeze nakon transplantacije KMS iz periferne krvi.<sup>14,60</sup> Ubrzani oporavak hematopoeze prate značajno manja potreba za transfuzijskim liječenjem, manji broj epizoda sepse, manja primjena antibiotika, kao i kraći boravak u bolnici nakon transplantacije.

Provjera učinkovitosti i sigurnosti transplantata KMS iz periferne krvi regulirana je nacionalnim i međunarodnim preporukama i standardima.<sup>61,62</sup> Kvaliteta prikupljenog produkta KMS za obnovu hematopoeze od primarne je važnosti za svakoga pojedinog bolesnika. Nakon završenog postupka leukaferoze uvijek se analizira kvaliteta prikupljenih stanica. Budući da za sada ne postoji općeprihvaćena metoda analize primitivne matične stanice, u praksi se kao indikator broja KMS u produktu leukaferoze rabe dva empirijski identificirana parametra: broj CD34+ stanica i broj kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica. Za ocjenu kvalitete transplantata ovi se pokazatelji izražavaju kao broj stanica po kilogramu tjelesne težine. Opće je prihvaćena primjena trenutačne (aktualne) tjelesne težine primatelja, ali razmatra se i primjena idealne tjelesne težine koja se izračunava formulom koja uključuje visinu i spol primatelja, budući da prema rezultatima više istraživanja bolje korelira s hematološkim oporavkom nakon autologne i alogene transplantacije.<sup>63</sup> Jednako je važna i sigurnost produkta leukaferoze s obzirom na moguće mikrobiološko onečišćenje. Uz laboratorijsko ispitivanje kontrole kvalitete priprema KMS obavezno se mora pratiti hematološki oporavak i klinički ishod

transplantacije, jer krajnja mjera kvalitete transplantata KMS jest brzina i trajnost oporavka funkcije koštane srži, kao i incidencija komplikacija povezanih s infuzijom produkta.

#### *Brojnost krvnih stanica u produktu leukafereze*

Broj stanica s jezgrom i mononuklearnih stanica daje prvu ocjenu kvalitete prikupljanja, a nužni su i za praćenje tehnike prikupljanja i ujednačenosti produkta. KMS se nalaze u populaciji prikupljenih mononuklearnih stanica, dok se granulociti, trombociti i eritrociti smatraju nepoželjnim u produktu leukafereze. Ako se prikupljanje ostalih stanica, u prvom redu trombocita i eritrocita ne smanji na minimum, kod bolesnika se mogu javiti trombocitopenija i anemija. Stanice koje su nepoželjne u produktu leukafereze mogu komplicirati obradu i zamrzavanje KMS, kao i povećati broj nuspojava kod transplantacije. Učinkovitost prikupljanja procjenjuje uspješnost izdvajanja željenih stanica iz krvi i treba biti dio trajnog programa osiguranja kvalitete u jedinici za aferezu.<sup>64</sup> Obvezatno je odrediti učinkovitost prikupljanja mononuklearnih i CD34+ stanica tijekom inicijalne evaluacije tehnike prikupljanja, kao i pri svakoj modifikaciji tehnike prikupljanja.

#### *Imunofenotipizacija protočnom citometrijom*

Biljeg CD34 izražen je na stanicama koje pokazuju sposobnost obnove svih krvnih loza *in vitro* i *in vivo*. Unutar odjeljka CD34+ stanica nalaze se primitivne KMS pa se ovaj biljeg danas rabi u procjeni kvalitete produkta leukafereze. Broj CD34+ stanica u perifernoj krvi i produktu leukafereze za potrebe transplantacije KMS određuje se imunofenotipizacijom stanica protočnim citometrom. Prednosti analize broja CD34+ stanica protočnom citometrijom jesu brzina dobivanja rezultata, osjetljivost i reproducibilnost.<sup>65</sup> Danas se primjenjuju dvije metode pri čemu se jedna oslanja na udio CD34+ stanica u leukocitima i podatke o broju leukocita s hematološkog brojača (engl. *double-platform*),<sup>66</sup> dok najnovija metodologija zahtijeva izračunavanje svih vrijednosti na samom protočnom citometru za što se rabe posebne baždarnе kuglice (engl. *single-platform*).<sup>67</sup> Rezultat se izražava kao postotak CD34+ stanica u određenim leukocitnim odjeljcima periferne krvi ili produktu leukafereze, a najvažniji podatak jest postotak CD34+ stanica na ukupan broj leukocita. Minimalna doza CD34+ stanica u transplantatu KMS iz periferne krvi je  $2 \times 10^6$ /kg, dok je za optimalni hematološki oporavak potrebno  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT.<sup>14,68,69</sup> Opisana je značajna linearna korelacija broja CD34+ stanica s oporavkom granulocita ili trombocita, ali i ovdje kao i kod broja CFU-GM-kolonija čini se da postoji prag broja CD34+ stanica iznad kojeg se ne može povećati brzina oporavka. Kod transplantata koji sadržava od 3 do  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT medijan oporavka trombocita bio je 12 dana, a kod transplantata s  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT medijan je bio 9 dana.<sup>68,69</sup> Daljnjim povećanjem broja transplantiranih stanica dodatno se ne skraćuje vrijeme potrebno za oporavak funkcije koštane srži.

#### *Kratkotrajna stanična kultura KMS*

Krvotvorne prastanice usmjerene u granulocitne (CFU-GM), eritroidne (BFU-E) ili primitivnije mješovite granulocitno/eritroidne prastanice (CFU-GEMM, CFU-Mix) mogu se identificirati metodom kratkotrajnog uzgoja stanica u polučvrstome mediju.<sup>70</sup> Minimalni broj CFU-GM u transplantatu KMS iz periferne krvi iznosi  $10 \times 10^4$ /kg, brzi-

na oporavka raste s porastom broja kolonija, a plato se doseže pri 30 ili čak  $50 \times 10^4$ /kg.<sup>14</sup> Između broja CD34+ stanica i CFU-GM-kolonija postoji značajna korelacija.<sup>64</sup> Glavno ograničenje ove metode je što su rezultati dostupni tek nakon 14 dana i ne može se primijeniti za dnevnu evaluaciju rezultata prikupljanja.<sup>64</sup> Prednost je stanične kulture što dokazuje i biološku aktivnost KMS te se smatra da je riječ o parametru koji najbolje odražava kvalitetu transplantata, što potvrđuje i njegova dobra korelacija s brzinom oporavka hematopoeze.<sup>64</sup>

#### *Ispitivanje vijabilnosti stanica*

Vijabilnost stanica može se ispitati bojenjem tripanskim plavilom i protočnom citometrijom bojenjem propidijskim jodidom ili 7-amino-aktinomicinom D (7-AAD). Ispitivanje vijabilnosti stanica prikupljenih leukaferezom pokazuje visok udio vijabilnih stanica, i to u prosjeku  $97,7 \pm 1,4\%$ .<sup>71</sup>

#### *Mikrobiološka analiza produkta leukafereze*

Dobra laboratorijska praksa nalaže da svaki laboratorij ima organiziran program nadzora reagensa i tehnika prikupljanja te obrade produkta s ciljem otkrivanja odstupanja od aseptičnih tehnika i sprječavanja mikrobiološke kontaminacije. Važeći standardi i preporuke zahtijevaju provođenje bakterijske i mikološke kulture pripravka KMS kako nakon prikupljanja tako i nakon obrade.<sup>61,62</sup> Jedan od izvora mikrobiološke kontaminacije može biti kateter za aferezu koji se može inficirati tijekom upotrebe. Druga je mogućnost da se tijekom leukafereze skupi i mikroorganizam koji se već nalazi u krvi bolesnika. Kad je bolesnik febrilan, leukafereza se može započeti 24 sata nakon primjene antibiotika. U tom slučaju obvezatno je uz hemokulturu produkta afereze učiniti i hemokulturu bolesnikove krvi.<sup>57</sup> Mikrobiološki kontaminirani produkti ne moraju obvezatno biti uništeni, jer je poznato da infuzija kontaminiranog produkta ne uzrokuje uvijek infekciju u primatelja.<sup>72</sup> Odluku o postupku s mikrobiološki kontaminiranim produktom donosi bolesnikov liječnik nakon razmatranja vrste uzročnika i potencijalne koristi i rizika od primjene kontaminiranog produkta.

#### *Analiza kontaminacije tumorskim stanicama*

Smatra se da produkt leukafereze sadržava manji broj tumorskih stanica od transplantata koštane srži.<sup>57</sup> Važnost nalaza ovih stanica za ishod transplantacije KMS iz periferne krvi još nije razjašnjena i većina centara standardno ne analizira kontaminaciju tumorskim stanicama. Metode za određivanje tumorske kontaminacije produkta leukafereze trebale bi otkriti razinu kontaminacije od 1 tumorske stanice na  $10^3$  do  $10^5$  normalnih stanica ili manje. Ako su dostupne molekularne probe za jedinstvene DNA-sljedove tumorskih stanica, metodom lančane reakcije polimerazom u produktu leukafereze mogu se otkriti prikupljene tumorske stanice.<sup>73</sup>

#### **Skrb za davatelje tijekom prikupljanja KMS iz periferne krvi**

Postupak leukafereze ne zahtijeva hospitalizaciju i može se provoditi ambulantno. Davatelj treba biti nadziran tijekom cijelog postupka zbog moguće pojave neželjenih reakcija. Vitalni znakovi (krvni tlak i puls) trebaju biti zabilježeni na početku leukafereze te potom svakih 30 minuta tijekom prikupljanja, a davateljevo stanje treba nadzirati i nakon leukafereze zbog mogućnosti pojave trombocitopenije i anemije koje treba prije sljedećeg postupka leukafereze zbrinuti transfuzijskim liječenjem. Leukafereza se pokazala kao

učinkovit i unatoč blažim nuspojavama siguran postupak koji je i za autologne i alogene davatelje prihvaćen kao metoda izbora za prikupljanje transplantata KMS.

## LITERATURA

- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 2006;169:338–46.
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006;441:1060.
- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006;116:1195–201.
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008;132:598–611.
- Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K i sur. Results of the EBMT activity survey 2006 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:687–705.
- Socinski MA, Cannistra AS, Elias A i sur. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in humans. *Lancet* 1989;1:1194–8.
- To LB, Shepperd KM, Haylock DN i sur. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* 1990;18:442–7.
- McCarthy DM, Goldman JM. Transfusion of circulating stem cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1984;20:1–24.
- Moog R. Management strategies for poor peripheral blood stem cell mobilization. *Transfus Apher Sci* 2008;38:229–36.
- van der Ham AC, Benner R, Vos O. Mobilization of B and T lymphocytes and haematopoietic stem cells by polymethacrylic acid and dextran sulphate. *Cell Tissue Kinet* 1977;10:387–97.
- Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976;47:1031–9.
- Herrmann F, Schulz G, Lindemann A i sur. Hematopoietic responses in patients with advanced malignancy treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Clin Oncol* 1989;7:159–67.
- Filshie R. Cytokines in haemopoietic progenitor mobilization for peripheral blood stem cell transplantation. *Curr Pharm Design* 2002;8:379–94.
- Ciavarella D. PBSC collection characteristics. U: Kessinger A, McMannis J, ur. Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation. Lakewood: COBE BCT; 1994, str.25–34.
- Levesque JP, Winkler I. Mobilization of hematopoietic stem cell: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:53–8.
- Nuamah NM, Goker H, Kilic YA i sur. Spontaneous splenic rupture in a healthy allogeneic donor of peripheral-blood stem cell following the administration of G-CSF. A case report and review of the literature. *Haematologica* 2006;91:26–8.
- Cavallaro AM, Lilley K, Majolini I i sur. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:85–9.
- Rhodes B, Anderlini P. Allogeneic peripheral blood stem cell collection as of 2008. *Transfus Apher Sci* 2008;38:219–27.
- Confer DL, Miller JP. Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. *Br J Haematol* 2007;137:77–8.
- Hill GR, Morris ES, Fuary M i sur. Allogeneic stem cell transplantation with peripheral blood stem cells mobilized by pegylated G-CSF. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:603–7.
- Devine SM, Vij R, Rettig M i sur. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 2008;112:990–8.
- Fruehauf S, Seeger T, Maier P i sur. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp Hematol* 2006;34:1052–9.
- Katayama Y, Battista M, Kao WM i sur. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006;124:407–21.
- Adams GB, Martin RP, Alley IR i sur. Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat Biotechnol* 2007;25:238–43.
- Ballen KK, Shpall EJ, Avigan D i sur. Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:838–43.
- Fabritius P, Gonzalez M, Meloni G i sur. Monitoring of CD34+ cells during leukapheresis allows a single, successful collection of hemopoietic progenitors in patients with low numbers of circulating stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1229–36.
- Haire WD, Lieberman RP, Lund GB i sur. Translumbar inferior vena cava catheters: safety and efficacy in peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 1990;30:511–5.
- Stephens L, Haire W, Tarantolo S i sur. Normal saline versus heparin flush for maintaining central venous catheter patency during apheresis collection of peripheral blood stem cells (PBSC). *Transfus Sci* 1997;18:187–93.
- Thompson L. Central venous catheters for apheresis. *J Clin Apheresis* 1992;7:154–7.
- Reik RA, Noto TA, Fernandez HF. Safety of large-volume leukapheresis for collection of peripheral blood progenitor cells. *J Clin Apheresis* 1997;12:10–3.
- Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM. Increase in circulating colony-forming units-granulocyte-macrophage during large-volume leukapheresis: evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 1991;31:327–32.
- Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD i sur. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* 1992;32:732–5.
- Murea S, Goldschmidt H, Hahn U i sur. Successful collection and transplantation of peripheral blood stem cells in cancer patients using large-volume leukaphereses. *J Clin Apheresis* 1996;11:185–94.
- Humpe A, Riggert J, Munzel U i sur. A prospective, randomized, sequential, crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effect on progenitor cells and engraftment. *Transfusion* 1999;39:1120–7.
- Gorlin JB, Vamvakas EC, Cooke E i sur. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: processing more blood diminishes the apparent magnitude of intra-apheresis recruitment. *Transfusion* 1996;36:879–85.
- Gasová Z, Marinov I, Vodvárková S i sur. PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients. *Transfus Apher Sci* 2005;32:167–76.
- Humpe A, Riggert J, Meineke I i sur. A cell-kinetic model of CD34+ cell mobilization and harvest: development of a predictive algorithm for CD34+ cell yield in PBPC collections. *Transfusion* 2000;40:1363–70.
- Hillyer CD, Lackey DA 3rd, Hart KK i sur. CD34+ progenitors and colony-forming units-granulocyte macrophage are recruited during large-volume leukapheresis and concentrated by counterflow centrifugal elutriation. *Transfusion* 1993;33:16–21.
- Hillyer CD, Swenson RB, Hart KK i sur. Peripheral blood stem cell acquisition by large-volume leukapheresis in growth factor-stimulated and unstimulated rhesus monkeys: development of an animal model. *Exp Hematol* 1993;21:1455–9.
- Kobbe G, Soehngen D, Heyll A i sur. Large volume leukapheresis maximizes the progenitor cell yield for allogeneic peripheral blood progenitor donation. *J Hematother* 1997;6:125–31.
- Bolin RB, Stewart DA, Cheney BA i sur. Granulocyte progenitor cell (CFUC) harvest by continuous apheresis in dogs. Effects of blood volume and lithium on yields. *Exp Hematol* 1983;11:226–30.
- Bojko P, Scharif M, Stössel K, Seeber S. Comparison of processing four and five times the patients' blood volume during peripheral blood stem cell collection and analysis of CD34+38- and CD34+49d+ subsets during apheresis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:19–28.
- Smolowicz AG, Villman K, Berlin G, Tidelfelt U. Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis. *Transfusion* 1999;39:403–9.
- Smolowicz AG, Villman K, Tidelfelt U. Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. *Transfusion* 1997;37:188–92.
- Bojanić I, Golubić B, Plenковиć F i sur. Influence of leukapheresis volume on the number of harvested peripheral blood hematopoietic progenitor cells. Abstract book of VIII European Congress of the International Society of Blood Transfusion, Istanbul 2003:P 206.
- Abrahamsen JF, Stammesfjet S, Liseth K i sur. Large-volume leukapheresis yields more viable CD34+ cells and colony-forming units than normal-volume leukapheresis, especially in patients who mobilize low numbers of CD34+ cells. *Transfusion* 2005;45:248–53.
- Zubair AC, Rymer R, Young J i sur. Multiple myeloma patients receiving large volume leukapheresis efficiently yield enough CD34+ cells to allow double transplants. *J Clin Apheresis* 2009;24:6–11.
- Diaz MA, Kanold J, Vincent MG i sur. Using peripheral blood progenitor cells for transplantation in pediatric patients: a state-of-the-art review. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1291–8.
- Bojanić I, Golubić B, Čepulić B, Rajić L i sur. Osobitosti sakupljanja krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi u pedijatrijskih bolesnika. *Liječ Vjesn* 2006;128:43–8.
- Buchta C, Macher M, Bieglmayer C i sur. Reduction of adverse reactions during autologous large-volume PBSC apheresis by continuous infusion of calcium-gluconate. *Transfusion* 2003;43:1615–21.
- Hester JP, Ayyar R. Anticoagulation and electrolytes. *J Clin Apheresis* 1984;2:41–51.
- Bolan CD, Leitman SF. Management of anticoagulation-associated toxicity during large-volume leukapheresis of peripheral blood stem cell donors. *Blood* 2002;99:1878.
- Haire W, Sniecinski I. Venous access, anticoagulation and patient care during apheresis. U: Kessinger A, McMannis J, ur. Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation. Lakewood: COBE BCT; 1994, str.11–24.



54. Golubić Čepulić B, Bojanić I, Plenković F i sur. Adverse events in collection of peripheral blood hematopoietic progenitor cells during five year period. *Bone Marrow Transplant* 2000;25 (Supp 1):S877.
55. Bolan CD, Cecco SA, Wesley RA i sur. Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. *Transfusion* 2002;42:935–46.
56. Humpe A, Riggert J, Munzel U, Köhler M. A prospective, randomized, sequential crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effects on serum electrolytes, platelet counts, and other coagulation measures. *Transfusion* 2000;40:368–74.
57. Mechanic SA. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells. U: McLeod B, Price T, Weinstein R, ur. *Apheresis: Principles and Practice*, 2. izd. Bethesda: AABB Press; 2003, str. 503–30.
58. Ruhl H, Bein G, Sachs UJ. Transfusion associated graft-versus-host disease. *Transfus Med Rev* 2009;23:62–71.
59. Dzik WH, Kirkley SA. Citrate toxicity during massive blood transfusion. *Transfus Med Rev* 1988:76–94.
60. Bender JG, Williams SF, Myers S i sur. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:281–5.
61. Vodič za kvalitetu i sigurnost u transplantaciji organa, tkiva i stanica, 3. izd. Europe NV: Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi; 2007, str. 56–58.
62. Standardi za prikupljanje, obradu i presađivanje hematopoetskih progenitorskih stanica, 2. izd. JACIE: 2005. [www.jacie.org](http://www.jacie.org).
63. Singh V, Krishnamurthy J, Duffey S i sur. Actual or ideal body weight to calculate CD34+ cell dose in patients undergoing autologous hematopoietic SCT for myeloma? *Bone Marrow Transplant* 2009;43:301–5.
64. Rowley S. Analysis of collected product. U: Kessinger A, McMannis J, ur. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation*, 1. izd. Lakewood: COBE BCT; 1994, str.35–51.
65. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Pediatr Croat* 2006;50:176–82.
66. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M i sur. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5:213–26.
67. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K i sur. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry* 1998;34:61–70.
68. Bender JG, To LB, Williams SF, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992;1:329–41.
69. Schulman KA, Birch R, Zhen B i sur. Effect of CD34+ cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol* 1999;17:1227–33.
70. Smalcelj R, Kusec V, Thune S, Petrovecki M. Circulating hematopoietic progenitors are not altered in patients with post-transplant erythrocytosis. *Haematologica* 1998;83:948–9.
71. Rowley SD, Yu J, Gooley T i sur. Trafficking of CD34+ cells into the peripheral circulation during collection of peripheral blood stem cells by apheresis. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:649–56.
72. Golubić Čepulić B, Bojanić I, Vukičević I i sur. Quality control is essential for prevention of bacterial contamination of bone marrow and peripheral blood stem cell grafts. *Vox Sang* 2000;78 (Suppl. 1):S683.
73. Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cell. *Blood* 1990;76:1879–89.



## Vijesti News

### HRVATSKA PROLJETNA PEDIJATRIJSKA ŠKOLA

organizira

## 27. seminar za liječnike i medicinske sestre Split, 19.—23. travnja 2010.



Na programu ovogodišnjeg seminara su sljedeće teme:

1. ENDOKRINOLOGIJA
2. ADOLESCENTNA MEDICINA
3. DJEČJA STOMATOLOGIJA

*Organizatori:* Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko pedijatrijsko društvo, Hrvatsko društvo za školsku i sveučilišnu medicinu, Hrvatska udruga medicinskih sestara – Pedijatrijsko društvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Klinički bolnički centar Split

*Informacije:* Prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj,

Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, 21 000 Split

Tel. 021/556-303; faks: 021/556-590

E-mail: [krzelj@kbsplit.hr](mailto:krzelj@kbsplit.hr); [www.kbsplit.hr/hpps.htm](http://www.kbsplit.hr/hpps.htm)

*Kotizacija:* 800 kuna