

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



## **Mobilizace hemopoetických progenitorových buněk z periferní krve**

**Daniel Lysák**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program vnitřní nemoci**

**Hradec Králové**

**2009**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu vnitřní nemoci na II. interní klinice – oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Student: MUDr. Daniel Lysák  
Hematologicko- onkologické oddělení, FN Plzeň  
I. interní klinika LF UK a FN Plzeň

Školitel: prof. MUDr. Jiří Horáček, CSc.  
II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové  
Katedra interních oborů LF UK a FN Hradec Králové

Školitel specialista: prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.  
II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové  
Katedra interních oborů LF UK a FN Hradec Králové

Školící pracoviště: II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové  
Katedra interních oborů LF UK a FN Hradec Králové

Oponenti: doc. MUDr. Edgar Faber, CSc.  
Hemato- onkologická klinika, FN Olomouc

doc. MUDr. Tomáš Kozák, PhD., MBA.  
Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA NR/9268-3 „Role adhezivních molekul a cytokinů v mobilizaci hemopoetických progenitorových buněk u zdravých dárců.“

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu vnitřní nemoci

## 1. Obsah

Titulní strana	.....	1
Obsah	.....	3
2. Souhrn	.....	4
3. Summary	.....	5
Seznam zkratk	.....	6
4. Úvod do problematiky	.....	7
5. Cíle disertační práce	.....	13
6. Metody a soubory pacientů	.....	13
7. Výsledky	.....	15
8. Diskuse	.....	21
9. Závěry	.....	27
10. Použitá literatura	.....	29
11. Přehled publikační činnosti autora	.....	34

## 2. Souhrn

Periferní kmenové buňky jsou v současné době hlavním zdrojem hemopoetických kmenových buněk pro účely autologních i alogenních transplantací. Na souborech pacientů a dárců, kteří byli mobilizováni k odběru HSC, jsme studovali klinické i laboratorní premobilizační a předodběrové parametry a posuzovali jsme jejich schopnost predikovat efektivitu mobilizace.

Při mobilizaci pacientů s chronickou lymfatickou leukémií a mnohočetným myelomem kombinací chemoterapie a růstového faktoru granulopoezy (G-CSF) byla zjištěna závislost hladiny CD34+ buněk cirkulujících v periferní krvi na parametrech krevního obrazu před zahájením mobilizace: hladina hemoglobinu, trombocytů. Pacienti s mnohočetným myelomem a s hemoglobinem > 108 g/l měli 3.35 x vyšší šanci na úspěšnou mobilizaci ve srovnání s pacienty s nižší vstupní hodnotou. U pacientů s CLL byla důležitým predikátorem výsledku mobilizace doba od poslední chemoterapie do mobilizačního pokusu (při intervalu < 2 měsíce pouze 8 % úspěšných mobilizací, při intervalu > 2 měsíce 50 % úspěšných mobilizací,  $p=0.0098$ ).

Na souboru zdravých dárců byl posuzován zejména vliv věku dárce na efektivitu mobilizace. Ukázalo se, že existuje negativní vztah mezi věkem dárce a množstvím CD34+ buněk vyplaveným do periferní krve ( $p<0.0001$ ,  $r_s = -0.40$ ) nebo odebraným v aferézním produktu ( $p<0.0001$ ,  $r_s = -0.39$ ). Vyšší věk alogenního dárce znamená zvýšené riziko suboptimální mobilizace a získání nedostatečného transplantátu. Sledovali jsme také výskyt nežádoucích účinků mobilizace a odběrů. Aferézy byly dobře tolerované u všech dárců, nicméně u starších jedinců byl zaznamenán vyšší výskyt nežádoucích reakcí (29 % vs. 15 %,  $p=0.0096$ ).

Byly testovány změny plazmatických hladin některých cytokinů a exprese některých adhezivních molekul na CD34+ buňkách vyvolané působením G-CSF. Při porovnávání předmobilizačních hladin cytokinů mezi dobře a špatně mobilizovatelnými dárci byl nalezen rozdíl pro sICAM-1 a hraničně i pro IL-6. Dále byl stanoven cut-off odlišující špatně a dobře mobilizovatelné dárce ještě před zahájením aplikace G-CSF, a to jak pro sICAM-1 (cut-off 100 ng/ml, odds ratio 4.8,  $p=0.0206$ , 95 % CI: 1.27 – 18.11) tak pro IL-6 (cut-off 32 pg/ml, odds ratio 15.6,  $p=0.0112$ , 95 % CI: 1.87 – 130.18). Vyšetřením exprese adhezivních molekul byl zjištěn negativní vztah mezi hladinou CD34+ buněk v den +5 mobilizace a expresí antigenů CD11a ( $p=0.0002$ ,  $r_s = -0.59$ ) a CD184 ( $p=0.0075$ ,  $r_s = -0.44$ ). Snížená exprese adhezivních molekul na mobilizovaných CD34+ buňkách odpovídala snížené adhezi k dřevnému stromatu a lepší mobilizovatelnosti.

Dále jsme prověřovali míru mezilaboratorní variability měření CD34+ buněk, které je nezbytné pro posuzování efektivity mobilizace i kvality transplantátu. Opakované provedení externí kontroly kvality vedlo ke snížení variability mezi jednotlivými laboratořemi.

Lze konstatovat, že při mobilizaci HSC je možné stanovit prediktivní faktory, které spoluurčují výsledek mobilizace. Žádný z těchto faktorů není schopen samostatně předpovědět výsledek mobilizace, ale jejich kombinace může prospektivně identifikovat špatně mobilizovatelné pacienty nebo dárce a umožnit modifikaci mobilizačního schématu.

### 3. Summary

Nowadays, the peripheral blood stem cells are the preferred source of the hematopoietic stem cells for autologous and allogeneic transplantations. We studied the clinical and laboratory premobilization and precollection parameters on groups of patients and donors mobilized for HSC collection and looked for their capability to predict the mobilization efficiency.

The mobilization of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma patients using combination of chemotherapy and granulocyte- colony stimulating growth factor (G-CSF) revealed the relation between the circulating CD34+ level in peripheral blood and certain blood count parameters before mobilization: haemoglobin level and platelets count. Multiple myeloma patients with haemoglobin > 108 g/l had 3.35 x higher chance of successful mobilization in comparison to those with lower entry levels. In CLL patients the time from the last chemotherapy to mobilization attempt was an important mobilization result predictor (successful mobilization rate only 8 % at interval < 2 months vs. 50 % at interval > 2 months,  $p=0.0098$ ).

The influence of the age on the mobilization efficiency was assessed in healthy donors groups especially. It was found that there is a negative correlation between the donor's age and the amount of CD34+ cells mobilized into peripheral blood ( $p<0.0001$ ,  $r_s= -0.40$ ) or collected into apheresis product ( $p<0.0001$ ,  $r_s= -0.39$ ). The higher age of an allogeneic donor means increased risk of the suboptimal mobilization and inadequate graft. We also observed the frequency of adverse reactions of the mobilization and collection procedures. Aphereses were well tolerated in all donors, however in older ones the higher rate of adverse events was recorded (29 % vs. 15 %,  $p=0.0096$ ).

The changes of the plasmatic levels of certain cytokines and the expression of adhesion molecules on CD34+ cell caused by G-CSF were tested. When comparing the premobilization cytokines levels between good and poor mobilized donors, the difference was found for sICAM-1 and borderline for IL-6. The cut-off, which might help to distinguish poor mobilizing donors before starting the G-CSF, was determined for both sICAM-1 (cut-off 100 ng/ml, odds ratio 4.8,  $p=0.0206$ , 95 % CI: 1.27 – 18.11) and IL-6 (cut-off 32 pg/ml, odds ratio 15.6,  $p=0.0112$ , 95 % CI: 1.87 – 130.18). The assessment of the adhesion molecules expression showed the negative relation between the CD34+ level in the peripheral blood on day +5 and the expression of antigens CD11a ( $p=0.0002$ ,  $r_s= -0.59$ ) and CD184 ( $p=0.0075$ ,  $r_s= -0.44$ ).

Furthermore we examined the extent of the interlaboratory variability of the CD34+ enumeration. This test is necessary for evaluation of the mobilization efficiency and the graft quality too. Repeated external quality control cycles resulted in the reduction of the variability among the laboratories.

In conclusion, it might be stated that some predictive factors, which determine the mobilization results, can be found for HSC mobilization. None of these factors itself is able to predict the mobilization results, however their combination can prospectively identify poor mobilized patients or donors and allow the modification of the mobilization protocol.

## Seznam zkratek

<b>CFU</b>	kolonie formující jednotka („colony forming unit“)
<b>CLL</b>	chronická lymfatická leukémie
<b>CXCR4</b>	chemokinový receptor 4 (CD184)
<b>EBMT</b>	Evropská skupina pro transplantaci kostní dřeně
<b>G-CSF</b>	růstový faktor granulopoezy (filgrastim)
<b>HPC</b>	hemopoetické progenitorové buňky
<b>HSC</b>	hemopoetické kmenové buňky
<b>ICAM-1</b>	„intracellular adhesion molecule“
<b>ISHAGE</b>	„International Society for Hematotherapy And Graft Engineering“
<b>NMDP</b>	„National Marrow Donor Program“
<b>MM</b>	mnohočetný myelom
<b>MMP-9</b>	„matrix metalloproteinase 9“
<b>NHL</b>	nehodgkinovský lymfom
<b>PBSC</b>	periferní kmenové buňky („peripheral blood stem cells“)
<b>SDF-1<math>\alpha</math></b>	„stromal cell-derived factor 1“ (CXCL12)
<b>TBV</b>	celkový objem krve („total blood volume“)
<b>VCAM-1</b>	„vascular cell adhesion molecule-1“
<b>VLA-4</b>	„very late antigen-4“ (CD49d)
<b>WMDA</b>	„World Marrow Donor Association“

## 4. Úvod do problematiky

### 4.1. Transplantace periferních kmenových buněk

#### 4.1.1. Transplantace HSC

Transplantace hemopoetických kmenových buněk je standardní léčebnou procedurou u řady hemato-onkologických i jiných nádorových onemocnění. V roce 2007 bylo v českých transplantačních centrech provedeno celkem 322 autologních a 211 alogenních transplantací. V rámci celé Evropy nahlásila transplantační centra sdružená v EBMT více než 20 000 nových transplantací (data z výroční zprávy EBMT).

#### 4.1.2. Zdroje kmenových buněk

Hemopoetické kmenové buňky (HSC) jsou nezadané, nespécializované buňky schopné vlastní sebeobnovy a diferenciaci. Úvodním krokem hematopoezy je diferenciaci HSC do hemopoetických progenitorových buněk (HPC), které se dále zadávají do jednotlivých krvetvorných linií. Tradičním zdrojem hemopoetických kmenových resp. progenitorových buněk byla kostní dřeň. Odhalení schopnosti HSC migrovat z kostní dřeně do periferní krve (mobilizace) a naopak se usazovat v kostní dřeni (homing) změnilo postupně klinickou praxi a kmenové buňky se začaly odebírat aferezou jako periferní kmenové buňky (PBSC). V současné době jsou periferní kmenové buňky preferovaným zdrojem HSC a jsou využívány u téměř 100 % autologních (data Transplantační sekce Hematologické společnosti ČLS JEP) a u cca 3/4 alogenních transplantací (data NMDP/EBMT). Oproti kostní dřeni nabízejí PBSC vyšší dávku CD34+ buněk, rychlejší přihojení, zkrácení doby hospitalizace, potencionálně nižší riziko peritransplantačních komplikací, méně zatěžující metodu odběru atd.

#### 4.1.3. Optimální dávka CD34+ buněk pro transplantaci

Hemopoetické kmenové buňky se identifikují a kvantifikují pomocí antigenu CD34+, který je exprimován na jejich povrchu. Optimální dávka CD34+ buněk nutná ke zdárnému průběhu transplantace se odvíjí od typu transplantace, zdroje HSC, intenzity předtransplantační přípravy, základního onemocnění, manipulace se štěpem atd. Za postačující dávku pro autologní transplantaci považuje většina center více než  $2 \times 10^6$  CD34+ buněk/kg hmotnosti pacienta. Dávka  $5 \times 10^6$ /kg je pak dávkou optimální, která poskytuje rychlý a predikovatelný engraftment (1, 2). Optimální dávka kmenových buněk pro alogenní transplantaci není jednoznačně stanovena, zpravidla se za ní považuje množství CD34+ buněk  $3 - 5 \times 10^6$ /kg hmotnosti příjemce.

### 4.2. Mechanismus mobilizace

#### 4.2.1. Biologie a mechanismy mobilizace HPC

Za normálních okolností jsou HSC usídlené v kostní dřeni a v periferní krvi cirkulují jen ve velmi malém množství (0.01 – 0.05 % leukocytů). Množství cirkulujících progenitorů může být zvýšeno jejich mobilizací z kostní dřeně pomocí cytokinů a/nebo

chemoterapie. Naopak po transplantaci jsou podané HSC schopné osídlení kostní dřeně, kde dochází k jejich přijetí a k obnově trilineární hematopoézy.

#### 4.2.2. Mikroprostředí kostní dřeně

Mikroprostředí kostní dřeně je tvořeno populacemi stromálních buněk, osteoblastů a osteoklastů v extracelulární matrix bohaté na fibronectin, kolagen a proteoglykany. HSC se nacházejí ve specifických oblastech kostní dřeně, které jim poskytují nezbytné signály pro jejich sebeobnovu a diferenciaci. Tyto oblasti se označují jako „stem cell niches“ (okrsky). V kostní dřeni myšího modelu byly nalezeny dva typy těchto okrsků: endostální (osteoblastický), ve kterých jsou HSC v kontaktu s osteoblasty a endoteliální (vaskulární), v nichž jsou HSC v blízkosti vaskulárních sinusů (3).

#### 4.2.3. Mobilizace a homing

Mobilizace a homing hemopoetických kmenových buněk jsou zrcadlové procesy regulované souhrou řady cytokinů, chemokinů a proteáz. Za normálních okolností existuje v kostní dřeni pool primitivních kmenových buněk, které kontinuálně produkují množství nezralých a vyžívajících myeloidních a lymfoidních elementů s omezenou životností, které jsou dále uvolňovány do periferní krve. Při mobilizaci opouštějí HSC osteoblastický okresek, dostávají se do vaskulárního okrsku a vstupují mezi endoteliálními buňkami do cévního řečiště, zatímco zároveň vyžívají a diferencují (4). Homing je opakem tohoto procesu. HSC z periferní cirkulace migrují transendoteliálně do vaskulárního a nakonec zpět do osteoblastického okrsku. Vazba hemopoetických kmenových buněk v mikroprostředí kostní dřeně je zprostředkována celou řadou adhezivních a chemotaktických interakcí. Adhezivní molekuly (zejména integriny – VLA-4, VLA-5 a selektiny) zprostředkovávají přiblížení a adhezi přijímajících se progenitorů k cévní stěně před jejich extravazací a usídlením v kostní dřeni. Naopak narušení těchto vazeb umožňuje opačný proces – tedy mobilizaci HSC do periferní krve. Pro mobilizaci lze využít několik různých molekul s různou kinetikou a různou efektivitou. V současné době je hlavním klinicky využívaným mobilizačním preparátem růstový faktor granulopoézy (G-CSF, filgrastim), a to z důvodu jeho dobré efektivity, předvídatelnosti a bezpečnosti.

#### 4.2.4. Centrální role CXCR4/SDF-1 $\alpha$ interakce

Chemokin SDF-1 $\alpha$  (CXCL12) je produkován osteoblasty a stromálními buňkami. SDF-1 $\alpha$  představuje gradient, ke kterému HSC migrují, a kterým jsou zachyceny v mikroprostředí kostní dřeně (5). Genetické experimenty potvrzují, že pro udržení HSC v kostní dřeni se jeví jako nejdůležitější chemotaktická osa CXCR4/SDF-1 $\alpha$ . Interakce mezi CXCR4 receptorem a jeho ligandem SDF-1 $\alpha$  hraje tedy klíčovou roli v regulaci usídlení, migrace a mobilizace HSC v průběhu „steady state“ hemopoézy a při mobilizačním podnětu (5).

#### 4.2.5. Ostatní adhezivní interakce



Pro homing a udržení HSC v kostní dřeni jsou vedle CXCR4/SDF-1 $\alpha$  cesty důležité ještě další adhezivní interakce. Stromální buňky exprimují VCAM-1, který se váže na svůj integrinový receptor VLA-4 na povrchu HSC. Vazba HSC je závislá také na přítomnosti heparan sulfátových proteoglykanů v extracelulární matrix, které jsou produkovány stromálními buňkami. Pohyb HSC je ovlivněn také interakcí antigenu CD44 a jeho ligandu – hyaluronové kyseliny. Svoji důležitou roli při homingu a mobilizaci hraje pravděpodobně i antigen CD26 (DPPIV/dipeptidyl-peptidáza IV) - peptidáza, která při mobilizaci mění chemokin SDF-1 $\alpha$  na jeho neaktivní formu (6).

#### 4.2.6. Nepřímá mobilizace pomocí G-CSF

Většina dosud používaných mobilizačních preparátů působí uvolnění HSC nepřímo. Indukují myeloidní expanzi, aktivaci a degranulaci, které vedou k uvolnění neutrofilních proteáz (neutrofilní elastáza, cathepsin G, MMP-9) v kostní dřeni. Tyto proteázy štěpí a inaktivují některé adhezivní vazby jako CXCR4/SDF-1 $\alpha$ , VCAM-1/VLA-4 a umožňují tak mobilizaci HSC (7). Typickým preparátem je již zmíněný růstový faktor granulopoezy (G-CSF), který je standardním mobilizačním cytokinem. Obdobně ale mohou působit i jiné neutrolily aktivující cytokiny jako IL-8, GRO- $\beta$  (váže se na CXCL2 receptor), které byly taktéž v minulosti jako mobilizační látky testovány. Příčinou down-regulace SDF-1 $\alpha$  je při aplikaci G-CSF vedle proteolytického působení také snížení transkripce SDF-1 $\alpha$  ve stromálních buňkách (8). G-CSF tak reguluje expresi SDF-1 $\alpha$  na úrovni mRNA.

#### 4.2.7. Přímá mobilizace (CXCR4)

V současné době je k dispozici několik antagonistů CXCR4, jeden z nich – plerixafor – prošel již klinickými studiemi fáze II a III provedenými na pacientech s NHL a MM i na zdravých dárcích (9, 10). Molekula byla původně vyvinuta jako protivirový preparát zabraňující vstupu HIV do CD4+ T- lymfocytů blokadí CXCR4 receptoru (11). Plerixafor se váže specificky na CXCR4 receptor a inhibuje SDF-1 $\alpha$  indukovanou internalizaci CXCR4. Efekt plerixaforu je synergistický s mobilizačním potenciálem G-CSF, proto se k mobilizaci pacientů i zdravých dárců využívá kombinace obou preparátů.

#### 4.3. Ostatní mobilizační preparáty

Vedle již zmíněných molekul existuje celá řada dalších preparátů, které jsou schopné indukovat mobilizaci HSC do periferní krve. Jejich použití může produkovat transplantáty, mezi kterými jsou kvantitativní ale i kvalitativní rozdíly. Přehled mobilizačních preparátů (6, 12, 13):

skupina	příklady	čas do maximální mobilizace
protilátky	anti-VLA-4, anti-VCAM-1	1 – 2 dny
chemokiny	GRO $\beta$ , CTCE0021, CTCE0214, MIP1 $\alpha$	15 min - 2 hod

antagonisté receptorů,  
inhibitory signálních cest

plerixafor, Rho GTPase  
inhibitor

1 – 6 hod

#### 4.4. Kvantifikace CD34+ buněk

Schopnost kvantifikovat CD34+ buňky je jedním ze základních předpokladů správného načasování leukaferéz, posouzení efektivity mobilizace a kontroly kvality odebraných transplantátů. Všeobecně přijatým postupem pro měření CD34+ buněk pomocí průtokové cytometrie je tzv. ISHAGE protokol, který nabízí vysokou míru standardizace a minimalizaci mezilaboratorní variability (14). S ohledem na zásadní klinický dopad měření je nezbytné, aby byly laboratoře zapojené do vhodných kontrolních systémů a kontinuálně ověřovaly přesnost a reprodukovatelnost svých měření (15).

Pro kvantifikaci CD34+ buněk lze využít i některé novější metodiky založené na principu stanovení enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH). Hemopoetické kmenové buňky mají vysoký intracelulární obsah ALDH, která je schopna přeměnit vhodný substrát na fluorescenční produkt stanovitelný průtokovou cytometrií.

#### 4.5. Mobilizace HPC pro autologní transplantaci (pacienti)

##### 4.5.1. Mobilizační schémata

Cytostatika byla prvními léky, které byly využívány k mobilizaci HSC v množství dostatečném pro zajištění vysocedávkované chemoterapie. S nástupem růstových faktorů granulopoezy se mobilizace začala provádět aplikací cytokinů nebo kombinace cytokinů a chemoterapie. Po stimulaci samotným G-CSF nebo kombinací chemoterapie plus G-CSF může minimální dávku  $2 \times 10^6$  CD34+ buněk/kg získat cca 60 % nebo až 90 % pacientů s mnohočetným myelomem respektive cca 30 % nebo více než 40 % pacientů s ne Hodgkinovským lymfomem (16). Rychlost přihojení i parametry přežití po autologní transplantaci jsou stejné u transplantátů získaných jak pomocí G-CSF tak kombinací chemoterapie plus G-CSF (17). Chemoterapie v mobilizačním schématu je bohužel spojena s vyšším rizikem infekčních komplikací, orgánové toxicity a častější potřebou hospitalizace. Kombinační stimulační režimy mají však své silné oprávnění u opakovaných mobilizací, kde může větší intenzita schématu prolomit neúspěch předchozího mobilizačního pokusu, a také u pacientů v parciální remisi onemocnění, kde může přispět k redukci zbylé nádorové masy.

#### 4.6. Mobilizace HPC pro alogenní transplantaci (zdraví dárce)

##### 4.6.1. Mobilizační schémata

Pro mobilizaci zdravých dárců je standardním a obecně akceptovaným cytokinem filgrastim. Jeho efektivita a bezpečnost je prověřena již cca patnáctiletou historií používání. Využívá se nejen pro mobilizaci příbuzných dárců, ale je akceptován také registry nepřibuzných dárců sdruženými do WMDA.

##### 4.6.2. Vztah mobilizace a kompozice transplantátu

Mobilizační preparát ovlivňuje buněčnou kompozici transplantátu, což má význam zejména u alogenních transplantací. Produkty periferních kmenových buněk získané pomocí G-CSF obsahují 10 – 50 x větší množství CD3+ buněk než kostní dřeň, což se projevuje zvýšeným rizikem chronické formy reakce štěpu proti hostiteli. Při porovnání transplantací PBSC a kostní dřeně není signifikantní rozdíl v celkovém přežití, naopak pacienti profitují z rychlejšího příhojení a nižšího rizika infekčních komplikací (1, 13, 18, 19).

#### 4.7. Faktory ovlivňující a predikující výsledek mobilizace

Nalézt fungující a použitelné faktory, které by umožnily předvídat výsledek mobilizace a prospektivně identifikovat špatně mobilizovatelné pacienty eventuelně dárce, je velmi obtížné. Existuje výrazná interindividuální variabilita v odpovědi na stimulaci. Je opakovaně popsána celá řada klinických a laboratorních prediktivních faktorů: typ a počet cyklů předchozí chemoterapie, typ základního onemocnění, stav onemocnění, doba od poslední chemoterapie do mobilizace, odpověď na úvodní léčbu, postižení kostní dřeně, věk, parametry krevního obrazu apod. (20). Žádný z těchto parametrů však neumožňuje spolehlivou předpověď výsledku mobilizace, nicméně jejich kombinace může u konkrétního jedince napovídat riziko obtížné mobilizace.

#### 4.8. Špatně mobilizovatelní pacienti a dárce („poor mobilizers“)

Část pacientů i dárců nereaguje na podaný stimulační režim a nevyplaví dostatečné množství CD34+ buněk, které by umožnilo úspěšnou aferezu a získání potřebného transplantátu. Definice nedostatečné odpovědi na stimulaci je dána zpravidla nedosažením určitého minimálního počtu CD34+ buněk v periferní krvi (mezi 10 a 20 CD34+ buněk/ $\mu$ l) nebo neschopností získat minimální akceptovatelný transplantát (zpravidla  $\geq 2 \times 10^6$  CD34+ buněk/kg hmotnosti příjemce) během maximálního počtu většinou 5-ti aferez. Zatímco u zdravých dárců se setkáváme se selháním mobilizace maximálně u 5 - 10 % jedinců (21), u pacientů může tato skupina tvořit 20 - 40 % mobilizací v závislosti na typu onemocnění, předchozí léčbě atd. (22, 23).

#### 4.9. Remobilizace

Při získání nedostatečného transplantátu se lze pokusit o opakování mobilizace s využitím jiného mobilizačního protokolu (remobilizaci). Existují různé strategie pro opakované mobilizace, které zahrnují zvýšení dávky G-CSF, kombinaci s jiným cytokinem, kombinaci s chemoterapií, použití intenzivnější chemoterapie, odběr kostní dřeně atd. Použití standardních schémat při opakovaných mobilizačních pokusech bohužel selhává až u 70 – 80 % pacientů (16, 22).

#### 4.10. Komplikace mobilizace

Sledování komplikací plynoucích z podávání růstového faktoru granulopoezy má zásadní důležitost zejména u zdravých dárců, kteří jsou tomuto preparátu vystaveni z důvodu darování a nikoliv vlastního onemocnění.

#### 4.10.1. Časné komplikace

Aplikace filgrastimu zdravým dárčům je dobře tolerovaná a zpravidla spojená pouze s mírnými nežádoucími účinky. Hlavním vedlejším účinkem podávání G-CSF jsou kostní bolesti vyskytující se až u 89 % dárců. Méně často se objevují ostatní obtíže jako bolesti svalů (49 %), nespavost (48 %), nauzea (26 %), nechutenství (22 %) atd. Většinou jde o mírné příznaky (grade 1, CTC NCI), které jsou omezeny na krátké období stimulace a odeznívají obratem (max. do 2 – 4 dní) po vysazení filgrastimu (11). Závažnější nebo dokonce život ohrožující události jsou extrémně vzácné (v roce 2007 bylo hlášeno 9 závažných komplikací na 8756 odběrů periferních kmenových buněk nebo kostní dřeně od nepříbuzných dárců, což odpovídalo méně než 0.103 % odběrů, údaje WMDA).

#### 4.10.2. Pozdní komplikace

Dlouhodobé účinky filgrastimu nejsou zdaleka tak dobře definované, a přestože se preparát v této indikaci používá již cca 15 let, nejsou stále vyloučeny pochybnosti o jeho možném vlivu na vznik hematologických onemocnění především leukémií. Tuto komplikaci je třeba aktuálně považovat pouze za čistě hypotetickou, protože do současné doby nebyla prokázána žádná asociace mezi krátkodobou aplikací G-CSF zdravým dárčům a eventuelním zvýšeným výskytem maligních onemocnění.

#### 4.11. Komplikace aferezy

Komplikace vzniklé v průběhu aferez jsou častější u autologních odběrů než u zdravých dárců. Vyplývá to z odlišné mobilizace často obsahující stimulační chemoterapii, předlčení pacientů, nižších parametrů krevního obrazu, častější nutnosti využít jako žilní přístup centrální žilní katétr atd. Frekvence komplikací udávaná různými autory kolísá v širokém rozmezí od 6 % do cca 30 % (11, 24). Nejčastěji se vyskytují problémy způsobené antikoagulací (citrátová toxicita) a komplikace ze strany žilního přístupu. Komplikace jsou většinou mírné a pouze 0.89 % reakcí je klasifikováno jako závažné nežádoucí reakce (11). V případě zdravých dárců jsou závažné nežádoucí reakce také relativně vzácné (0.6 %), mají většinou akutní charakter a jsou rychle řešitelné. K jejich klasifikaci ve smyslu závažných nežádoucích reakcí často přispívá pouze nutnost hospitalizace dárce nebo jejího prodloužení. Nejčastějšími symptomy jsou: výraznější citrátová toxicita, trombocytopenie, nauzea a zvracení, komplikace centrálního žilního katétru, bolesti na hrudi atd. (25).

## 5. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce je studium problematiky mobilizace a odběru hemopoetických kmenových buněk z periferní krve. Hlavní zájem se soustředí především na problematiku prediktivních faktorů efektivity mobilizace u pacientů i zdravých dárců. Práce se bude věnovat několika problémům:

1. Sledování premobilizačních a předodběrových faktorů ze strany pacienta nebo dárce, které mohou pomoci odhadovat efektivitu stimulace a její výsledek. Posouzení prediktivního významu těchto parametrů.
2. Samostatné zhodnocení vlivu věku alogenního dárce na efektivitu mobilizace mezi příbuznými i nepříbuznými dárci.
3. Sledování kinetiky vyplavování CD34+ buněk do periferní krve po různých mobilizačních schématech.
4. Výskyt nežádoucích reakcí a komplikací mobilizace pomocí G-CSF a odběru u alogenních dárců. Zhodnocení vlivu eventuálních přidružených onemocnění dárce na bezpečnost procedury.
5. Studium změn hladin některých cytokinů a změn exprese některých adhezivních molekul na CD34+ buňkách vyvolaných stimulací G-CSF u zdravých dárců. Posouzení využitelnosti těchto parametrů, jejichž vývoj odráží změny adhezivních interakcí mezi hemopoetickými kmenovými buňkami a mikroprostředím kostní dřeně, jako prediktivních faktorů.

## 6. Metody a soubory pacientů

### 6.2. Pacienti

Analyzovány byly dva soubory nemocných s frekventními nádorovými onemocněními krvetvorby – chronickou lymfatickou leukémií (CLL) a mnohočetným myelomem (MM).

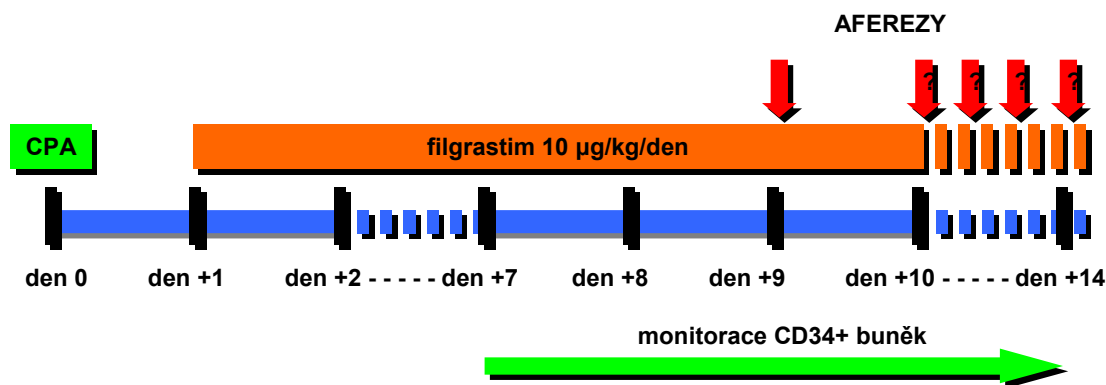
#### 6.2.1. CLL pacienti

Studováno bylo 56 pacientů s chronickou lymfatickou leukémií léčených chemoterapií fludarabin a cyklofosfamid v první linii léčby v letech 1998 - 2003. Pouze 12 % pacientů bylo krátce předléčeno chlorambucilem (medián 4 cykly, maximálně 6 cyklů). Po dosažení kompletní (CR, 16 pacientů) nebo nodulární/parciální remise (nPR/PR, 40 pacientů) podle NCI kritérií byli pacienti mobilizováni z důvodu plánované konsolidace vysocedávkovanou chemoterapií. Mobilizační režim byl tvořen kombinací cyklofosfamidu v dávce 3 g/m<sup>2</sup> a filgrastimu 10 µg/kg/den (ode dne +1). Mobilizace byla zahájena minimálně 2 měsíce od poslední chemoterapie, medián intervalu mezi posledním chemoterapeutickým cyklem a mobilizací byl 77 dní (rozmezí 35 – 242). Cílová dávka CD34+ pro provedení autologní transplantace byla stanovena na  $\geq 2.0 \times 10^6$ /kg hmotnosti pacienta.

#### 6.2.2. MM pacienti

Mobilizováno bylo 73 pacientů s mnohočetným myelomem po léčbě protokolem VAD, pouze 5 pacientů bylo krátce předléčeno alkylačními cytostatiky (melphalan, < 6 měsíců). Pacienti byli léčeni v letech 1999 – 2003. Jako mobilizační protokol byl použit cyklofosfamid (3 g/m<sup>2</sup> 64 pacientů, 5 g/m<sup>2</sup> 9 pacientů) a filgrastim v dávce 10 µg/kg/den. Cílem bylo získat minimální dávku CD34+ buněk ≥ 4.0 x 10<sup>6</sup>/kg hmotnosti pacienta k zajištění dvou vysocedávkovaných chemoterapií s autologní transplantací.

Mobilizační schéma – pacienti s chronickou lymfatickou leukémií nebo mnohočetným myelomem



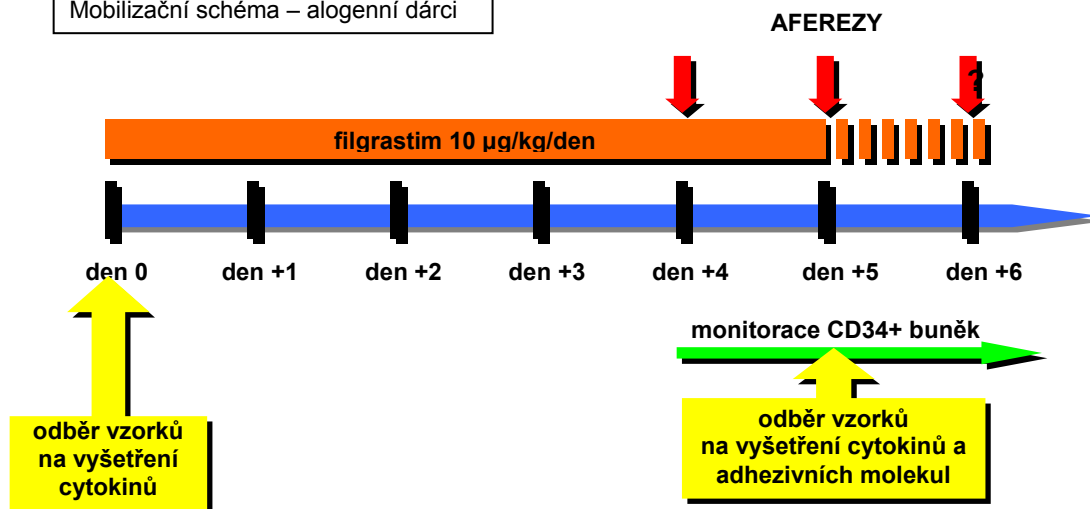
pozn.: pro CLL dávka cyklofosfamidů 3 g/m<sup>2</sup>, pro mnohočetný myelom 3 g/m<sup>2</sup> nebo 5 g/m<sup>2</sup>  
CPA = cyklofosfamid

### 6.3. Zdraví dárce

Analyzovány byly dva soubory po sobě jdoucích zdravých dárců, kteří byli mobilizováni v období 1/2000 až 6/2008.

První soubor byl tvořen celkem 224 dárci, kteří byli rozděleni do dvou skupin podle věku. Skupina 103 dárců nad 50 let věku byla porovnávána se skupinou 121 mladších dárců < 50 let. Starší dárci byli příbuzní, naopak mladší dárci byli většinou (69 %) nepříbuzní dobrovolníci z Českého národního registru dárců dřeně. Medián věku dárců byl 59 (rozmezí 55 – 75) versus 29 (17 – 48) let. Dárci byli stimulováni filgrastimem v dávce 11 µg/kg/den (medián, rozmezí 9 - 16) aplikovaným podkožně v jedné nebo dvou denních dávkách. Preparát byl podáván po dobu 4 až 5-ti dnů. Cílová dávka CD34+ buněk byla ≥ 4 x 10<sup>6</sup>/kg hmotnosti příjemce, minimální akceptovatelná dávka ≥ 2 x 10<sup>6</sup>/kg.

Mobilizační schéma – alogenní dárci



Přidružená onemocnění dárců byla skórována podle Charlson Comorbidity Indexu (26). Frekvence komorbidit byla vyšší mezi staršími dárci (54 %) ve srovnání s mladšími (6 %),  $p < 0.0001$ .

Druhý soubor byl tvořen 60 dárci (25 příbuzní, 35 nepříbuzní) s mediánem věku 39 (26 – 67) let. Dárci byli stimulováni filgrastimem v dávce 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$  aplikovaným podkožně v jedné denní dávce po dobu 5-ti dní. Efektivita stimulace byla u tohoto souboru posuzována podle hladiny CD34+ buněk vyplavených do periferní krve, kvalita aferézního produktu nebyla sledována.

Klinicky relevantní nežádoucí účinky filgrastimu a vlastního odběru byly zaznamenávány u všech dárců a hodnoceny podle Common Toxicity Criteria skóre (NCI CTC verze 3.0).

#### 6.3.1. Stanovení CD34+ buněk a adhezivních molekul

Imunofenotypizace CD34+ buněk byla prováděna standardní vícebarevnou průtokovou cytometrií na cytometru Coulter Epics XLII (software systém II.). CD34+ buňky byly kvantifikovány podle ISGAGE protokolu, „double platform“ metodou. Ke stanovení byl využit následující panel protilátek: anti-CD34-PE, anti-CD45-FITC a 7-AAD. Adhezivní molekuly CD11a, CXCR4, CD44, CD117, CD26, CD49d byly vyšetřovány na CD34+ buňkách v den +5 stimulace, jakmile byli dárci hospitalizováni k odběru PBSC.

#### 6.3.2. Stanovení cytokinů

Pro studii byly zvoleny takové analyty, o kterých jsme se na základě literárních dat domnívali, že mohou být ovlivněny procesem mobilizace. Koncentrace cytokinů (SDF-1 $\alpha$ , sICAM-1, sVCAM-1, MMP-9, IL-6, IL-8, fractalkine, TNF $\alpha$ , VEGF a E-selectin) byly detekovány pomocí ELISA metod nebo využitím multiplexové technologie. Vzorky séra a plazmy dárců byly odebírány před zahájením stimulace (den +0) a před první aferezou (den +5). Ve vzorcích séra byla stanovena hladina IL-6, IL-8, fractalkine, TNF $\alpha$ , VEGF a ve vzorcích plazmy hladiny sICAM-1, sVCAM-1, MMP-9, E-selektin pomocí multiplexové imunoanalýzy využívající xMAP technologii (LUMINEX). Měření proběhlo na přístroji Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, USA). Ve vzorcích plazmy byla dále stanovena hladina SDF-1 $\alpha$  metodou ELISA. Všechna stanovení byla provedena v dubletu.

Na souborech pacientů nebyla tato analýza prováděna, protože jsou zde k dispozici jiné prognostické faktory a lze také očekávat výrazně větší biologickou variabilitu analytů danou základním onemocněním a jeho léčbou.

## 7. Výsledky

### 7.2. Úvod.

Na testovaných souborech jsme posuzovali efektivitu mobilizace, jejíž měřítkem byla maximální hladina CD34+ buněk vyplavených do periferní krve a množství progenitorů odebraných při afereze. Hledali jsme předstimulační a předodběrové klinické a laboratorní parametry, které by mohly korelovat s efektivitou mobilizace, a které by mohly sloužit

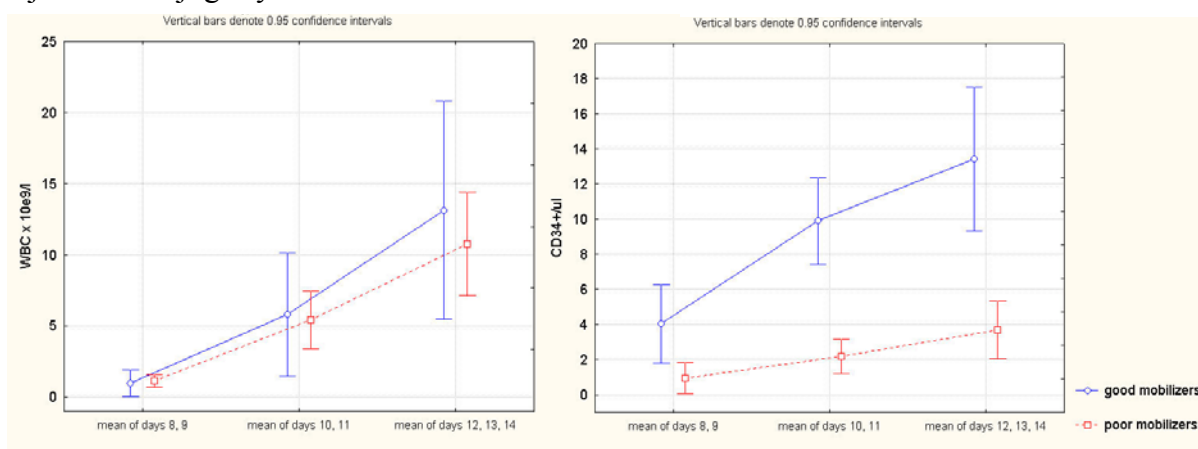
jako prediktivní faktory umožňující odhadovat výsledek celé procedury u konkrétního pacienta nebo zdravého dárce.

### 7.3. Mobilizace HPC kombinací chemoterapie a G-CSF u pacientů s CLL

#### 7.3.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk

Celý soubor 56 pacientů s chronickou lymfatickou leukémií byl rozdělen do dvou skupin podle schopnosti dosáhnout minimální hladiny cirkulujících CD34+ buněk v periferní krvi ( $> 10$  buněk/ $\mu\text{l}$ ) a/nebo nastřádat požadovaný autologní transplantát ( $\geq 2.0 \times 10^6/\text{kg}$  CD34+ buněk). Mobilizační procedura byla úspěšná u 23 pacientů (dobře mobilizovatelní, 41 %), k selhání stimulace došlo u 33 pacientů (špatně mobilizovatelní, 59 %). Mezi skupinami nebyl rozdíl ve věku, pohlaví, stadiu onemocnění v době diagnózy, době od diagnózy do mobilizace a kvalitě remise v době mobilizace. Předstimulační parametry krevního obrazu (leukocyty, hemoglobin a trombocyty) byly signifikantně vyšší ve skupině úspěšně mobilizovaných, naopak selhání mobilizace bylo spojeno s nižšími hodnotami..

Maximální hladina CD34+ buněk dosažená v periferní krvi po dobu monitorace – mezi dny +9 až +12 – byla 25.0/ $\mu\text{l}$  u úspěšně mobilizovaných a 3.4/ $\mu\text{l}$  u nonresponderů (mediány,  $p < 0.0001$ ). Kinetika leukocytů byla v obou skupinách stejná ( $p = 0.6909$ ), zatímco kinetika CD34+ měla jiný průběh ( $p < 0.0001$ , parametrická repeated ANOVA), jak dokládají grafy:



Podle Spearmanovy analýzy koreloval počet CD34+ buněk pozitivně s některými předafereťickými parametry krevního obrazu jako jsou trombocyty ( $p = 0.0037$ ,  $r_s = 0.40$ ), hemoglobin ( $p = 0.0004$ ,  $r_s = 0.47$ ), leukocyty ( $p = 0.0003$ ,  $r_s = 0.49$ ) a negativně s věkem pacienta ( $p = 0.0156$ ,  $r_s = -0.34$ ).

Při testování mnohonásobnou regresí se jako nezávislé faktory ovlivňující výsledek mobilizace ukázaly hladina hemoglobinu před stimulací ( $p = 0.0127$ ,  $\text{Beta} = 0.31$ ), věk pacienta ( $p = 0.0132$ ,  $\text{Beta} = -0.39$ ) a především doba od poslední chemoterapie ( $p = 0.0004$ ,  $\text{Beta} = 0.43$ ). Pro úspěšnou mobilizaci by interval mezi poslední chemoterapií a mobilizací neměl být kratší než 2 měsíce (při intervalu  $< 2$  měsíce pouze 8 % úspěšných mobilizací, při intervalu  $> 2$  měsíce 50 % úspěšných mobilizací,  $p = 0.0098$ ).

#### 7.3.2. Remobilizace



Část pacientů (11 pacientů) s CLL jsme po předchozí neúspěšné mobilizaci kombinací cyklofosfamidu a G-CSF remobilizovali samostatným filgrastimem podávaným ve vyšších dávkách (20 – 25 µg/kg/den). Medián intervalu od předchozí mobilizace byl 7 měsíců (3 – 12) a doba od poslední dávky fludarabinu do remobilizace byla 9 měsíců (5 – 15). Maximální hladina CD34+ buněk v periferní krvi – 8.0/µl – byla dosažena v den +5 (4 – 6). Pouze u 4 pacientů byly zahájeny aferezy, které vedly k nedostatečným výtěžkům s mediánem 0.6 x 10<sup>6</sup>/kg CD34+ buněk.

#### 7.4. Mobilizace HPC kombinací chemoterapie a G-CSF u pacientů s MM

##### 7.4.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk

Soubor 73 pacientů s mnohočetným myelomem byl opět rozdělen do dvou skupin podle schopnosti získat dávku CD34+ buněk ( $\geq 4.0 \times 10^6/\text{kg}$ ) nezbytnou k zajištění dvou autologních transplantací jedinou aferezou. Naplnit cílový požadavek jedním odběrem se podařilo u 71 % pacientů (skupina A), zatímco u zbylých 29 % byla potřeba více než jedna afereza (medián 2, skupina B). Obě skupiny byly srovnatelné s ohledem na věk, pohlaví, stadium onemocnění v době diagnózy a odpověď na úvodní chemoterapii. Z parametrů krevního obrazu před mobilizací byla mezi skupinami hraničně odlišná pouze hladina hemoglobinu ( $p=0.0363$ ).

Pomocí mnohonásobné regrese jsme testovali vliv předmobilizačních parametrů krevního obrazu, věku a doby od diagnózy na efektivitu mobilizace (hladinu CD34+ v periferní krvi před první aferezou). Závislost byla přítomna pouze pro hladinu hemoglobinu ( $p=0.0118$ , Beta=0.28). Hladina hemoglobinu zároveň negativně korelovala s počtem dní do vzestupu CD34+ buněk v periferní krvi a zahájení leukaferéz ( $p=0.0035$ ,  $r_s=-0.32$ ).

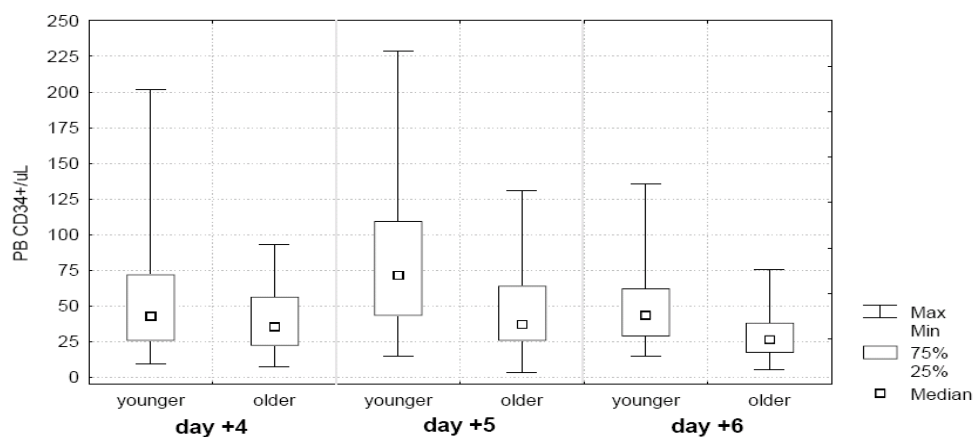
Pro hladinu hemoglobinu jsme našli cut-off, které napomáhá odlišit hůře mobilizovatelné jedince. Pacienti s hemoglobinem  $> 108 \text{ g/l}$  mají 3.35 x vyšší šanci na úspěšnou mobilizaci ve srovnání s pacienty s nižší vstupní hladinou ( $p=0.0363$ , odds ratio 3.35, 95 % CI: 1.08 – 10.39).

Kinetika CD34+ buněk byla odlišná a to zejména na začátku monitorovacího období (den +8 až +10). Hladina CD34+ buněk před první aferezou byla výrazně vyšší ve skupině A – medián 97.0/µl vs. 28.0/µl ( $p<0.0001$ ).

#### 7.5. Mobilizace zdravých dárců pomocí G-CSF

##### 7.5.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk

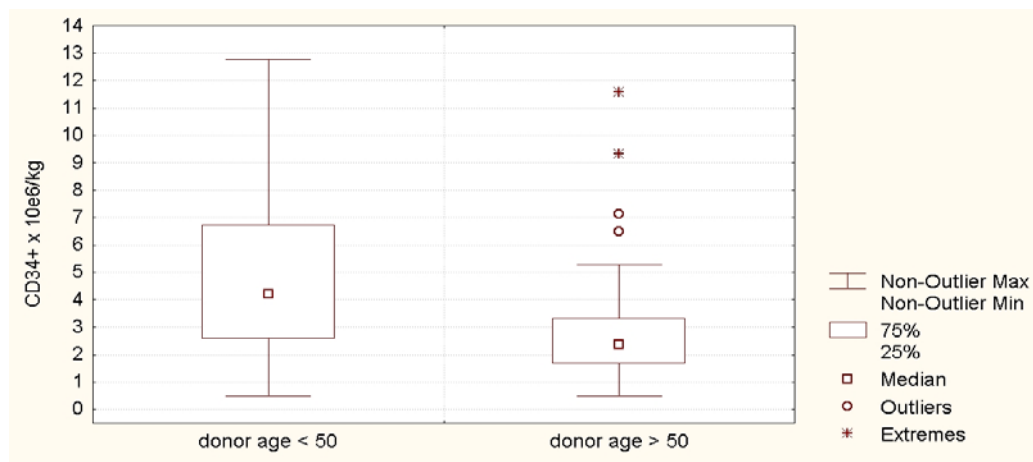
Na souboru 224 dárců jsme sledovali vývoj parametrů krevního obrazu v průběhu mobilizace a porovnávali jsme rozdíly mezi skupinou starších ( $> 50$  let) a mladších ( $< 50$  let) dárců. Počty leukocytů mezi dny 4 – 6 byly v obou skupinách obdobné a dosahovaly maxima v den +5 s mediánem  $43.2 \times 10^9/l$  u starších a  $41.7 \times 10^9/l$  u mladších (ns, neparametrický mediánový test). Absolutní hodnota CD34+ buněk v den +5 byla však u mladých dárců téměř dvojnásobná ve srovnání se staršími (72.0 vs. 37.0 buněk/µl,  $p<0.0001$ , neparametrický mediánový test), jak dokládá graf:



Analýza celého souboru Spearmanovými pořadovými korelacemi prokázala silnou závislost mezi věkem dárce a hladinou CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 ( $p < 0.0001$ ,  $r_s = -0.40$ ). Multivariantní analýza pomocí mnohonásobné regrese potvrdila nezávislý negativní dopad věku ( $p < 0.001$ ,  $Beta = -0.36$ ) a pozitivní dopad hladiny leukocytů v den +5 ( $p < 0.0001$ ,  $Beta = 0.48$ ) na hladinu CD34+ buněk v periferní krvi před aferézou. Ostatní parametry jako dávka filgrastimu, frekvence aplikace nebyly statisticky významné.

#### 7.5.2. Aferézní produkt

Medián počtu aferéz nutných k získání požadovaného transplantátu byl 2 v celém souboru (1 – 4). Během první aferézy se podařilo u starších dárců nastřádat medián 2.37 ( $0.49 - 11.56$ )  $\times 10^6/\text{kg}$  CD34+ buněk, zatímco u mladších bylo dosaženo dávky 4.22 ( $0.51 - 12.79$ )  $\times 10^6/\text{kg}$  ( $p < 0.0001$ , neparametrický mediánový test), viz graf:

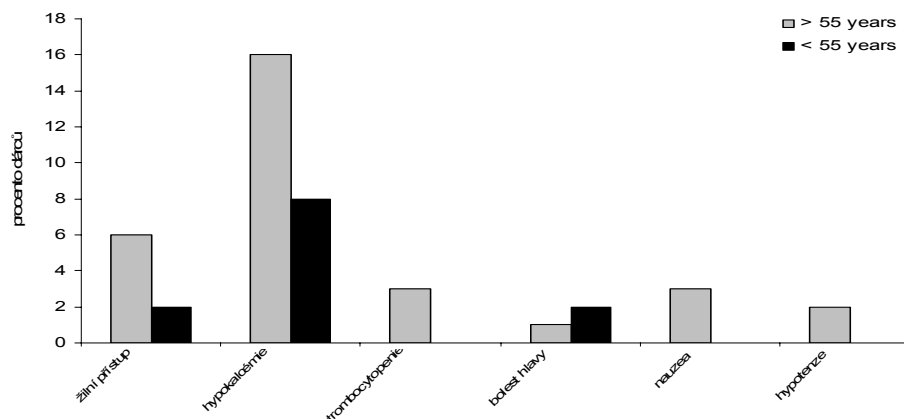


Při lineární regresi se projevil vliv věku na výtěžek CD34+ buněk ( $p < 0.0001$ ,  $r_s = -0.39$ , Spearmanova pořadová korelace). 39 % mladších dárců nastřádal cílovou dávku CD34+ buněk jednou aferézou, v případě starších dárců postačovala jediná aferéza pouze u 9 % dárců ( $p < 0.0001$ ). Naopak 7 % starších a pouze 0.8 % mladších dárců nezareagovalo na filgrastim a bylo u nich konstatováno selhání mobilizace s neschopností získat alespoň minimální akceptovatelný transplantát  $\geq 2.0 \times 10^6/\text{kg}$  ( $p = 0.0164$ , chí- kvadrát test). Multivariantní analýza mnohonásobnou regresí následně potvrdila věk ( $p = 0.0392$ ,  $Beta = -0.12$ ), hladinu CD34+ ( $p < 0.0001$ ,  $Beta = 0.68$ ) a

trombocytů ( $p=0.0144$ ,  $Beta=0.14$ ) jako statisticky významně nezávislé proměnné, které spoluurčují výsledek aferezy. Počet CD34+ buněk v periferní krvi byl podle očekávání nejsilnějším prediktivním faktorem, ovšem jeho hodnoty významně souvisely s věkem dárce.

### 7.5.3. Nežádoucí účinky stimulace a aferezy u zdravých dárců

Mobilizace i afereza byly u všech dárců dobře tolerovány, nevyskytly se žádné závažné nežádoucí reakce. Vedlejší účinky aplikace filgrastimu se presentovaly bez ohledu na věk dárce (41 % starších resp. 49 % mladších dárců,  $p=0.1680$ , chi-kvadrát test) a zahrnovaly zejména: výrazné bolesti kostí (33 %), bolesti hlavy (10 %), „flu-like“ syndrom (7 %). Méně často byla pozorována únava (2 %) a subfebrilie (1 %). Příznaky byly mírné až střední intenzity (medián toxicity 2 podle CTC NCI). Nežádoucí reakce spojené s vlastní aferezou byly častější u starších dárců (29 % versus 15 %,  $p=0.0096$ , chi-kvadrát test). 64 % těchto reakcí u starších dárců se objevilo u subjektů s komorbiditami. Nejčastější reakce jsou sumarizovány v grafu:

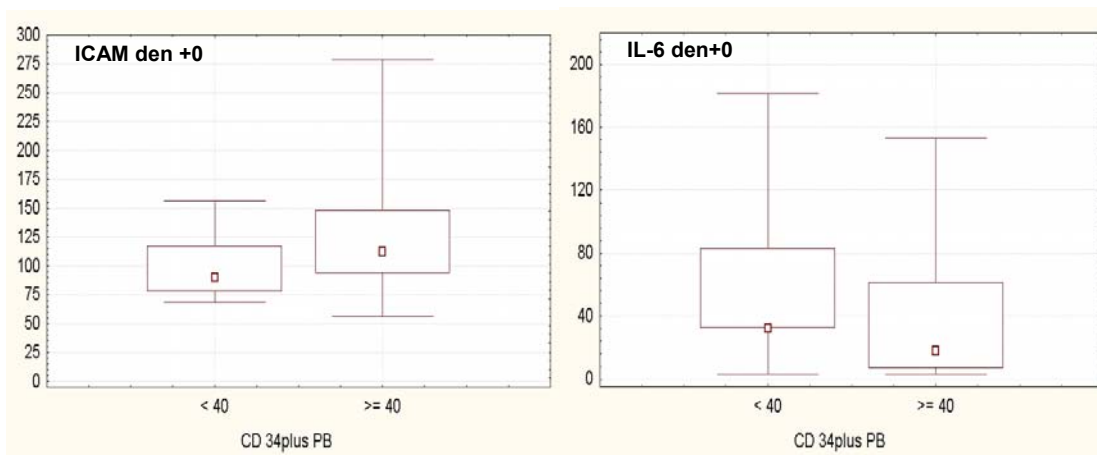


### 7.5.4. Kinetika a prediktivní význam cytokinů při G-CSF mobilizaci

Na druhém souboru 60 zdravých dárců jsme se zabývali sledováním vývoje hladin některých cytokinů a exprese adhezivních molekul v průběhu mobilizace.

Spearmanovými pořadovými korelacemi byl zjištěn pozitivní vztah mezi hladinou CD34+ buněk v periferní krvi dárce v den +5 a hladinami sVCAM-1 ( $p<0.0001$ ,  $r_s=0.55$ ) a sICAM-1 ( $p=0.0011$ ,  $r_s=0.41$ ) taktéž v den +5. Zároveň byl nalezen hraniční negativní vztah mezi hladinou IL-6 v den +0, tedy před stimulací, a hladinou CD34+ buněk v den +5 ( $p=0.0861$ ,  $r_s= -0.23$ ). Tento analyt bude dále sledován na větším souboru dárců.

Dále byli dárce rozděleni do dvou skupin podle efektivity mobilizace. Jako hranice pro odlišení dobře a špatně mobilizovatelných dárců byla stanovena hodnota 40.0 CD34+/ $\mu$ l v den +5. 78 % dárců dosáhlo hladin nad tuto hodnotu a 22 % dárců pod tuto hodnotu, tito dárce byli následně označeni jako špatně mobilizovatelní. Mezi oběma skupinami dárců byly Wilcoxonovým testem zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách některých analytů: sICAM-1 v den +0 ( $p=0.0369$ ) a v den+5 ( $p=0.0023$ ), sVCAM-1 v den +5 ( $p=0.0117$ ), IL-8 v den +5 ( $p=0.0473$ ) a hraniční rozdíl pro IL-6 v den +0 ( $p=0.0776$ ). Detaily viz grafy:



Použitím kontingenčních tabulek a logistické regrese byly hodnoty sICAM-1 a IL-6 v den +0 (tedy před stimulací) testovány jako možné predikátory efektivity a výsledku stimulace. Hladina sICAM-1 pod cut-off 100 ng/ml znamenala cca 5 x vyšší riziko nedostatečné mobilizace (odds ratio 4.8,  $p=0.0206$ , 95 % CI: 1.27 – 18.11). Naopak v případě IL-6 znamenaly hladiny nad cut-off 32 pg/ml cca 16 x vyšší riziko nedostatečné mobilizace (odds ratio 15.6,  $p=0.0112$ , 95 % CI: 1.87 – 130.18).

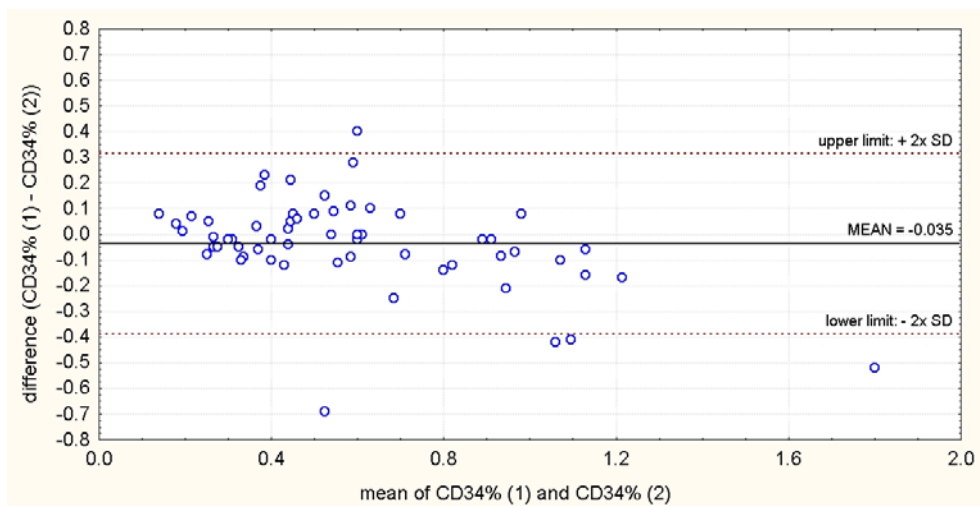
#### 7.5.5. Adhezivní molekuly na CD34+ buňkách

Imunofenotypizace adhezivních molekul na povrchu CD34+ buněk v den +5 mobilizace prokázala negativní vztah mezi hladinou CD34+ buněk v periferní krvi a expresí dvou adhezivních molekul (v %): CD11a ( $p=0.0002$ ,  $r_s = -0.59$ ) a CD184 ( $p=0.0075$ ,  $r_s = -0.44$ , Spearmanova pořadová korelace). Pro posouzení event. rozdílů v distribuci adhezivních molekul s ohledem na efektivitu mobilizace byla testována také intenzita exprese jednotlivých antigenů vyjádřená v relativních jednotkách (MnI). Také v tomto případě byly znaky CD11a ( $p=0.0040$ ) a CD184 ( $p=0.0418$ ) vyjádřeny signifikantně méně na CD34+ buňkách od dobře mobilizovatelných dárců.

#### 7.6. Kontrola kvality transplantátu

Ve snaze ověřit správnost kvantifikace CD34+ buněk jako jednoho z hlavních parametrů kontroly kvality transplantátu jsme provedli dva testy, které měly ověřit míru variability měření v různých laboratořích a vzájemnou reprodukovatelnost výsledků.

Nejprve jsme retrospektivně porovnali výsledky měření CD34+ buněk v transplantátech od nepříbuzných dárců, které byly prostřednictvím ČNRDD vyměněny mezi naším transplantáčním centrem a partnerskými centry v různých zemích. Analyzováno bylo celkem 84 produktů (56 % export, 44 % import). Mediány procentuálního zastoupení CD34+ buněk byly dle našich měření 0,54 % (0,18 – 1,54), dle měření partnerských center 0,46 % (0,10 – 2,06). Rozdíly v absolutních množstvích CD34+ buněk byly  $3,76 (0,31 - 12,21) \times 10^8$  vs.  $3,87 (0,42 - 13,50) \times 10^8$ . Spearmanovými pořadovými korelacemi bylo prokázáno, že si výsledky našeho i partnerských center odpovídají jak pro procento CD34+ buněk ( $p<0.0001$ ,  $r_s=0.8509$ ) tak pro jejich množství - CD34+  $\times 10^8$  ( $p<0.0001$ ,  $r_s=0.9434$ ), viz graf:



Jako další krok jsme iniciovali provedení externí kontroly kvality pro stanovení CD34+ buněk v rámci českých transplantačních center. V průběhu roku 2008 jsme ve dvou kolech rozeslali do 10-ti transplantačních center kontrolní vzorky stabilizované mobilizované periferní krve. Při prvním kontrolním cyklu jsme zaznamenali značnou variabilitu měření s řadou odlehlých hodnot. Při druhém kontrolním cyklu byla již variabilita měření podstatně nižší a také průměrné skóre jednotlivých laboratoří se snížilo z 20,39 na 8,09. Přestože kvantifikace CD34+ buněk průtokovou cytometrií je vedle počítání CFU stále hlavním ukazatelem „potence“ transplantátu, prosazují se i nové metody detekce kmenových buněk. Jednou z těchto metod je stanovení aktivity enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH). V rámci testování a implementace této metody jsme analyzovali vzorky z autologních transplantátů u 50 pacientů s NHL. Při současném měření počtu HSC oběma metodami jsme prokázali dobrou korelaci stanovení progenitorů pomocí CD34+ antigenu a ALDH, bez statisticky signifikantního rozdílu hodnot ( $p < 0.0001$ ,  $r_s = 0.9765$ ).

## 8. Diskuse

### 8.1. Faktory ovlivňující efektivitu mobilizace u pacientů

Jedním ze základních faktorů ovlivňujících nebo dokonce znemožňujících mobilizaci je typ a množství předchozích chemoterapií. Někteří autoři definovali počty chemoterapií spojené s rizikem nedostatečné mobilizace. Seggewissová se setkala se signifikantně nižším množstvím odebraných CD34+ buněk u pacientů, kteří byli před mobilizací léčeni více než 6 cykly chemoterapie (27). Výsledek mobilizace je určen také typem chemoterapie podané v rámci standardní léčby malignity. Někteří cytostatika jako alkylační látky, purinová analoga prokazatelně snižují pravděpodobnost úspěšné mobilizace (28).

Fludarabin používaný k léčbě CLL je citován jako jedna z příčin špatných mobilizačních výsledků u těchto pacientů (29, 30). Na druhou stranu řada autorů potvrzuje, že předchozí léčba fludarabinem nebrání úspěšnému získání autologního transplantátu (31). V naší analýze byla jediným rizikovým faktorem nedostatečné mobilizace doba od poslední dávky fludarabinu, interval menší než 2 měsíce byl spojen s nedostatečnou mobilizací. Vliv intervalu od poslední chemoterapie do mobilizace potvrdili i jiní autoři (32, 33). Pravděpodobně je nepříznivý dopad cytostatické léčby na mikroprostředí kostní dřeně

dočasný a dostatečně dlouhé období bez další toxicity umožňuje obnovu funkce a mobilizační kapacity kostní dřeně.

Pro odhad výsledku mobilizace lze u pacientů využít také parametry krevního obrazu před stimulací. V našich souborech jsme našli závislost mezi hodnotami leukocytů, trombocytů resp. hemoglobinu před stimulací a hladinou CD34+ buněk před aferezou. Prokazovali jsme také jejich signifikantní rozdíly mezi dobře a špatně mobilizovatelnými pacienty. Především hladina hemoglobinu měla významný prediktivní charakter, jak u pacientů s mnohočetným myelomem, tak u pacientů s CLL. Jednoznačné hranice nelze z naší práce stanovit, nicméně hladina  $\geq 110$ -120 g/l byla spojena s vyšší pravděpodobností úspěšné mobilizace. Naopak dlouhodobá pancytopenie indikovala vysoké riziko selhání mobilizace zejména po standardních stimulačních protokolech založených na cyklofosfamidu.

## 8.2. Faktory ovlivňující efektivitu mobilizace u dárců

Informací o faktorech, které spoluurčují výsledek mobilizace u zdravých dárců, není mnoho. Diskutuje se vliv věku dárce, pohlaví, dávky a způsobu aplikace růstového faktoru atd. V současné době je standardním a všeobecně akceptovaným dávkováním filgrastimu 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ , vyšší dávky se nedoporučují pro výrazný nárůst projevů akutní toxicity a jsou opodstatněné pouze v ojedinělých případech obtížně mobilizovatelných dárců. V našem souboru jsme závislost výsledku mobilizace na režimu dávkování ani na dávce filgrastimu nepozorovali, dávkování se však pohybovalo v relativně úzkém rozmezí (9 – 16  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ ). Menší výtěžky CD34+ buněk, uváděné při odběru žen v porovnání s muži (34, 35), souvisí s nižší hmotností a celkovým objemem krve i kostní hmoty u žen. Po odstranění hmotnostních rozdílů vyjádřením výtěžku na kg hmotnosti dárce nebo litr TBV byly v našem souboru výtěžky srovnatelné bez ohledu na pohlaví, podobně jako u jiných autorů (36).

Hladina CD34+ buněk ovšem korelovala u našich dárců pozitivně předodběrovými hladinami leukocytů s trombocytů. Tuto závislost potvrdili i jiní autoři (37). Přes tento vztah mezi hladinou leukocytů a CD34+ buněk se nejeví samotná hodnota leukocytů jako vhodný parametr pro rozhodování o zahájení leukeféze a je třeba vždy vycházet z koncentrace CD34+ buněk.

Počet dárců, u kterých došlo k selhání mobilizace, se pohyboval od 0.8 % do 7.0 % v závislosti na věku. Ings ve své studii - na souboru dárců s mediánem věku 38 let - označil 2 % dárců jako neschopné získat minimální štěp (35). Lze předpokládat že s rostoucím věkem se podíl obtížně mobilizovatelných dárců zvyšuje a roste riziko získání suboptimálního transplantátu (blíže viz. bod 8.3.).

## 8.3. Vliv věku dárce na efektivitu mobilizace

Věk pacientů indikovaných k alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk se v posledních letech zvýšil. Díky dostupnosti nemyeloablativní předtransplantační přípravy a zlepšení podpůrné léčby může být transplantační postup nabídnut i starším nemocným. Léčba hemato-onkologických nemocných vyššího věku znamená potřebu odběru hemopoetických kmenových buněk od starších příbuzných dárců. Odběry periferních

kmenových buněk od starších jedinců jsou spojeny s některými specifickými problémy. Řada autorů považuje vyšší věk dárce za důležitý rizikový faktor ovlivňující resp. limitující efektivitu mobilizace (34, 36, 38 - 40), jiní autoři tuto skutečnost nepotvrzují (41 - 44). Výpovědní hodnota některých těchto studií je ovšem omezená pro nedostatečnou velikost souborů a relativně nízký věk dárců (s mediánem pod 50 let).

Odpověď zdravého jedince na G-CSF je velmi variabilní a špatně mobilizovatelní dárce se nacházejí ve všech věkových skupinách. Někteří z nich nejsou schopni nastřádat minimální dávku -  $2 \times 10^6$ /kg CD34+ buněk na kg hmotnosti příjemce - doporučovanou pro alogenní transplantaci. V našem souboru byla frekvence selhání mobilizace 7 % u starších a 0.8 % u mladších dárců. Věk dárce negativně koreloval s množstvím CD34+ buněk ve stimulované periferní krvi i v aferézním produktu.

Při odběrech zdravých dárců je vždy naší snahou získat optimální transplantát, zároveň však minimalizovat rizika a nepohodlí dárce, omezit co nejvíce dobu podávání a dávku G-CSF a počet aferez. Ideální by byla možnost předjímat výsledek stimulace, předem identifikovat dárce se suboptimální odpovědí na G-CSF a reagovat na tuto skutečnost úpravou stimulačního režimu: zvýšením dávky G-CSF nebo v budoucnu použitím některé nové stimulační molekuly – např. plerixaforu. Bohužel žádný universální prediktivní faktor není k dispozici, nicméně specifická skupina dárců jako jsou starší lidé může s sebou nést zvýšené riziko nedostatečné mobilizace.

Vliv věku jako jednoho z premobilizačních faktorů se uplatňuje i u pacientů. Neexistuje sice žádná věková hranice, za níž by nebylo možné úspěšný odběr provést, nicméně s věkem se dle řady prací množství získatelných CD34+ buněk snižuje (45). Také my jsme pozorovali negativní korelaci věku s hladinou CD34+ buněk u pacientů s CLL.

#### 8.4. Kinetika CD34+ buněk při mobilizaci

Možnost stanovení optimálního okamžiku pro odběr hemopoetických kmenových buněk z periferní krve přináší řadu logistických i ekonomických výhod. Bohužel u pacientů s hematologickými malignitami se může kinetika CD34+ buněk značně lišit v závislosti na řadě proměnných. Kinetika hladin CD34+ v periferní krvi je dána především použitým stimulačním režimem, tedy hlavně typem zvolené chemoterapie, která se kombinuje s G-CSF. Při použití méně intenzivních protokolů, založených na různě dávkovaném cyklofosfamidu ( $1.5 - 7.0 \text{ g/m}^2$ ), nastává první afereza již cca od dne +9, zatímco u intenzivnějších protokolů (DexaBEAM, HAM apod.) je třeba s odběrem počítat až po dni +14. U výrazně předléčených nemocných se může peak CD34+ buněk v periferní krvi ještě dále posouvat (27). Maximálních hladin CD34+ buněk v našich souborech pacientů mobilizovaných kombinací cyklofosfamid plus G-CSF bylo v periferní krvi dosahováno ve dnech 9 – 12.

Zdraví dárce dosahují při mobilizaci pomocí G-CSF maximální hladiny leukocytů v den +6 a maximální hladiny CD34+ buněk v den +5 eventuálně +6 (46, 47, 48). Podobná kinetika vyplývá i z naší předchozí analýzy (40). K maximálnímu vzestupu hladiny CD34+ buněk docházelo mezi dny +4 a +5.

### 8.5. Nežádoucí účinky mobilizace G-CSF a aferezy

Při odběru zdravých dárců je prioritou číslo jedna ochrana zdraví dárce a minimalizace rizika komplikací plynoucích z darování. Mírnou akutní toxicitu G-CSF (grade 1 dle CTC NCI), která se projevuje především bolestmi kostí a svalů a únavou, udává až 80 % dárců (25). V našem souboru byla aplikace G-CSF spojena s akceptovatelnou akutní toxicitou, která se vyskytovala ve stejné míře v obou skupinách – starších i mladších – dárců (40 – 50 %). Komplikace aferezy jsme zaznamenali častěji (starší dárce 29 %, mladší dárce 15 %) v porovnání s jinými pracemi (7 %), nicméně tento rozdíl může být dán odlišným vyhodnocováním citrátové toxicity jako jedné z hlavních komplikací (11). Každopádně pouze 1 % komplikací bylo hodnoceno jako závažné, což odpovídá literárním údajům i datům z registrů dárců (11, 49).

Zvláštní skupinu dárců z hlediska možných komplikací spojených s odběrem jsou starší dárce. Tito jedinci mají různá přidružená onemocnění, která mohou snižovat jejich toleranci mobilizace i odběru. Existují práce dokládající bezpečnost odběru CD34+ buněk u dárců nad 60 let věku včetně těch, kteří mají nějaké komorbidity (50). Rozsáhleji však tato problematika nebyla dosud studována. Otázkou je nejen, zda jsou tito dárce dostatečně efektivní k získání uspokojivého transplantátu, ale také, zda jsou dostatečně zdraví, aby mohli podstoupit odběr bez zdravotních následků a to bez ohledu na jejich přidružená onemocnění? Je vůbec rozumné a bezpečné žádat tyto silně motivované dárce o darování? Nebo je správnějším řešením hledat mladého nepříbuzného dárce? Naše zkušenost potvrzuje, že starší jedinci mohou být využiti jako dárce krvetvorných buněk pro alogenní transplantaci. Měla by však u nich být posouzena nejen legislativou požadovaná způsobilost, ale důkladně také jejich faktická únosnost k odběru.

Nežádoucí reakce a komplikace u pacientů stimulovaných kombinací chemoterapie a růstového faktoru granulopoezy jsou pochopitelně výrazně častější a pestřejší a vyplývají z myelotoxicity stimulační chemoterapie, přechodné pancytopenie i základního onemocnění a jeho předchozí léčby.

### 8.6. Pozdní účinky mobilizace G-CSF u zdravých dárců

Zvláštní kapitolou je problematika hypotetického dlouhodobého efektu filgrastimu u zdravých dárců a sice jeho možná asociace s leukemogenezí a vývojem maligního onemocnění (leukémie) u dárce. Riziko se doposud nepodařilo prokázat a odpovědět na tuto otázku se pokoušejí registry dárců, které koncentrují velké množství dárců resp. odběrů a dlouhodobě je sledují. Avšak ani na těchto datech zahrnujících tisíce dárců nebyl dosud zvýšený výskyt malignit pozorován (51, 52, 53).

Zkušenosti Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) a Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň odpovídají citovaným údajům. Z celkového počtu 250 mobilizovaných alogenních dárců byl vznik nádorového onemocnění zaznamenán pouze u tří příbuzných dárců (ca plic, NHL, AML). 80 % dárců bylo sledováno minimálně po dobu jednoho roku (54). Aktuálně lze konstatovat, že po aplikaci G-CSF nedochází ke změně výskytu nádorových onemocnění, neboť množství uváděných malignit odpovídá očekávané



incidenci v dospělé populaci a neliší se signifikantně od výskytu mezi jedinci, kteří nebyli G-CSF exponováni.

Nedostatkem většiny studií je omezená doba sledování, která snižuje výpovědní hodnotu dat i přes velké počty sledovaných subjektů. Doba sledování je kratší než doba potřebná ke vzniku maligního onemocnění a při extrémně nízkém riziku musí být dárci sledováni řadu let, aby mohlo být eventuální zvýšené riziko vzniku leukémie prokázáno. K posouzení rizika by bylo potřeba sledovat více než 2000 dárců po dobu minimálně 10 let, aby bylo možno detekovat desetinásobné zvýšení rizika vzniku leukémie po podání G-CSF. Detekce menšího rizika, které předpokládáme, by vyžadovala samozřejmě větší soubory (55). Dosavadní data tedy mohou být nepřesná.

#### 8.7. Prediktivní význam cytokinů

Mobilizace HSC je spojena se změnou hladiny řady cytokinů, chemokinů, eventuálně solubilních adhezivních molekul. Vlivem G-CSF stoupá hladina MMP-9, IL-6, sVCAM-1, sICAM-1, klesá hladina SDF-1 $\alpha$ , jiné analyty jako TNF- $\alpha$  zůstávají beze změny (55 - 59). Podobnou dynamiku měly tyto analyty i v naší analýze.

Dosquetová našla u pacientů s mnohočetným myelomem stimulovaných chemoterapií plus G-CSF vztah mezi hladinou CD34+ buněk a sVCAM-1 v den aferezy (60). Náš soubor potvrdil tuto pozitivní závislost a zároveň ukázal negativní korelaci platnou pro IL-6.

Hladiny uvedených analytů se liší také mezi skupinami dobře a obtížně mobilizovatelných dárců. Tuto závislost jsme našli v den +5 pro sICAM-1, sVCAM-1, IL-8 a především v den +0 (před mobilizací) pro sICAM-1 a IL-6. Pro tyto dva analyty jsme byli schopni stanovit cut-off, který odlišuje s cca 70 % pravděpodobností špatně mobilizovatelné dárce ještě před zahájením podávání G-CSF a celého procesu darování. Měření hladin těchto analytů může teoreticky sloužit k prospektivní identifikaci dárců, kteří se pravděpodobně budou obtížně mobilizovat (zejména v kombinaci s vyšším věkem dárce).

#### 8.8. Prediktivní význam adhezivních molekul

Mobilizace vyvolaná G-CSF vede ke změnám exprese některých adhezivních molekul na povrchu CD34+ buněk. Mobilizace je spojena s down-regulací CD44, CD49d (VLA-4), CD184 (CXCR4) na CD34+ buňkách v kostní dřeni ve srovnání se stavem před mobilizací (61). Při porovnání intenzity exprese adhezivních molekul před- a po aplikaci G-CSF zdravým dárčům je přítomna významná redukce exprese CD11a, CD49d i CD62L (62).

Řada prací prokazuje inverzní vztah mezi expresí adhezivních molekul na CD34+ buňkách a kvalitou mobilizace (63, 64). HSC dobře mobilizovatelných dárců exprimují méně intenzivně tyto molekuly (především CD49d, CD184) než je tomu u špatně mobilizovatelných jedinců. Snížení exprese adhezivních molekul na mobilizovaných CD34+ buňkách odpovídá snížené adhezi k dřevovému stromatu. Naše výsledky dokládají sníženou expresi CD184 a CD11a na CD34+ buňkách dobře mobilizovatelných dárců a také negativní korelaci s množstvím CD34+ buněk pro CD184 a CD11a. Bohužel žádný z těchto parametrů neumožňuje samostatně dostatečně spolehlivou predikci výsledku mobilizace.

## 8.9. Remobilizace

Pacienti, u kterých selhala mobilizace a pro které je vysocedávkovaná chemoterapie optimální léčebnou modalitou, mohou být indikováni k dalším mobilizačním pokusům. Zásadními otázkami při jejich plánování je zvolení vhodného mobilizačního režimu a také načasování remobilizace. Opakování stejného mobilizačního schématu většinou nevede k úspěchu. Někteří pacienti mobilizovaní kombinací chemoterapie plus filgrastim mohou být úspěšně remobilizováni pouze růstovým faktorem (65), nejlépe ve vyšších dávkách (až 20 – 30 µg/kg), neboť u pacientů i zdravých dárců je prokázána závislost získané dávky CD34+ buněk na dávce G-CSF (66, 67). Naše limitovaná zkušenost s remobilizací pomocí vysocedávkovaného G-CSF u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií bohužel ukázala malou efektivitu tohoto postupu - u žádného nemocného se nepodařilo získat dostatečný transplantát. K obdobným závěrům dospěli i jiní autoři, kteří byli schopni získat minimální štěp ( $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ ) maximálně u 10 – 20 % pacientů s CLL (68, 69).

## 8.10. Variabilita měření CD34+ buněk mezi centry

Hodnocení efektivity mobilizace, porovnání různých mobilizačních schémat a mobilizačních výsledků mezi jednotlivými jedinci i různými pracovišti předpokládá dostupnost spolehlivé metody kvantifikace CD34+ buněk s minimální intra- a interlaboratorní variabilitou. Před zavedením standardizovaných protokolů se pohybovaly rozdíly naměřených hodnot CD34+ buněk mezi laboratořemi v řádu desítek procent (70). Akceptováním jednotných protokolů, především tzv. ISHAGE platformy (14), a implementací systémů externí kontroly kvality došlo k výraznému omezení mezilaboratorní variability (15). Sami jsme v dřívější práci potvrdili dobrou úroveň standardizace měření CD34+ buněk mezi evropskými transplantačními centry. Nalezli jsme dobrou korelaci mezi měřeními provedenými na stejných transplantátech v různých centrech (71). Ověřili jsme také pozitivní dopad externí kontroly kvality na mezilaboratorní variabilitu měření v rámci českých transplantačních center. Již po prvním kontrolním cyklu došlo k poklesu průměrného skóre určujícího odchylku měření napříč laboratořemi ze 20.39 na 8.09. Uvedené údaje dokládají přetrvávající důležitost standardizace této základní cytometrické metody, důležitost organizování cyklů externí kontroly kvality a různých workshopů.

Nevýhodou obvykle používaných ukazatelů kvality transplantátu – obsah CD34+ buněk a viabilita – je skutečnost, že nevypovídají o růstovém potenciálu štěpu. Vyšetřování kolonie formujících jednotek (CFU) je časově náročné, zatížené určitým subjektivismem. Objevují se však nové instrumentální proliferační testy. Jedním z nich je detekce progenitorových buněk pomocí stanovení aldehyddehydrogenasy, která oproti stanovení CD34+ imunofenotypu vypovídá o aktivitě HSC a jejich schopnosti tvořit kolonie. Kvantifikace CD34+ buněk imunofenotypizací a stanovením ALDH aktivity dobře koreluje.

## 9. Závěry

Z uvedených výsledků vyplývá, že byly zcela naplněny hlavní cíle disertační práce a to především:

- 9.1. Na souborech pacientů i zdravých dárců byly nalezeny některé faktory, které ovlivňují efektivitu mobilizace a mohou, zejména ve své kombinaci, sloužit jako prediktivní ukazatele výsledku mobilizace:
  - před zahájením mobilizace: pacienti - hladina hemoglobinu, trombocytů, doba od poslední chemoterapie, věk; dárce – věk
  - před odběrem: pacienti a dárce - hladina leukocytů, trombocytů, CD34+ buněk
- 9.2. Hladina hemoglobinu před mobilizací umožňuje u pacientů s mnohočetným myelomem odlišit jedince s vyšším rizikem problematické mobilizace. U pacientů s CLL hraje důležitou roli doba od poslední chemoterapie do mobilizace. Pokud je tento interval kratší než 2 měsíce, výrazně roste pravděpodobnost selhání mobilizace.
- 9.3. Bylo potvrzeno, že vyšší věk dárců je spojen s vyšším rizikem obtížné mobilizace a s častější potřebou více než jednoho odběru k získání požadované dávky CD34+ buněk. Při kumulaci věku s ostatními rizikovými faktory a s přihlédnutím k přidruženým onemocněním dárce je třeba zvažovat v konkrétních případech alternativního dárce nebo v budoucnu použití jiné mobilizační molekuly.
- 9.4. Ukázalo se, že kinetika vyplavování CD34+ buněk do periferní krve je dosti uniformní po stimulaci samostatným G-CSF a naopak silně variabilní po režimech kombinujících chemoterapii + G-CSF. Sledování této kinetiky je hlavním vodítkem umožňujícím správné načasování aferéz.
- 9.5. Vyhodnocením nežádoucích reakcí bylo zjištěno, že mobilizace periferních kmenových buněk pomocí G-CSF a jejich odběr aferézou jsou u zdravých dárců spojeny s přijatelnou mírou časných nežádoucích účinků. I u starších dárců s přidruženými chorobami jde o bezpečnou a dobře tolerovanou metodu. Otevřená zůstává problematika dlouhodobých nepříznivých účinků, které nebyly dosud jednoznačně prokázány, a k řešení této otázky je nezbytné využít velkých souborů z registrů dárců a genetické epidemiologické studie.
- 9.6. Byly testovány nové laboratorní parametry vyplývající ze současných znalostí procesu mobilizace a bylo potvrzeno, že některé z nich mají potenciál stát se přínosnými prediktivními faktory. Asociaci s efektivitou mobilizace vykazují některé adhezivní molekuly (CD184, CD11a) a zejména hladiny některých cytokinů/chemokinů (IL-6, sICAM-1) detekované před mobilizací.
- 9.7. IL-6 a sICAM stanovené před mobilizací jsou hlavními kandidáty použitelných prediktivních faktorů. Lze pro ně stanovit vhodné cut-off odlišující špatně a dobře mobilizovatelné dárce. Jejich zařazení do kontextu ostatních prediktivních faktorů může

zvýšit pravděpodobnost úspěšného odhalení špatně mobilizovatelného jedince před zahájením mobilizačního pokusu.

9.8. Oproti původně stanoveným cílům byla navíc ověřena míra mezilaboratorní variability měření CD34+ buněk jako hlavního parametru kontroly kvality transplantátu a byl potvrzen značný význam externí kontroly kvality pro snižování této variability v našich podmínkách.

9.9. Byla zavedena nová metoda detekce hemopoetických kmenových buněk pomocí stanovení aldehyddehydrogenázy průtokovou cytometrií.

## 10. Použitá literatura

1. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.2003;419-437.
2. Shpall EJ, Champlin R, Glaspy JA. Effect of CD34+ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol Blood Marrow Transplant* 1998; 4: 84-92.
3. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988.
4. Yin T, Linheng Li. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006; 116: 1195-1201.
5. Weidt C, Niggemann B, Kasenda B, Drell TL, Zänker KS, Dittmar T. Stem cell migration: a quintessential stepping stone to successful therapy. *Cur Stem Cell Res Ther* 2007; 2: 89-103.
6. Fruehauf S, Server T, Topaly J. Innovative strategies for PBPC mobilization. *Cytotherapy* 2005; 7: 438-446.
7. Winkler IG, Levesque JP. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol* 2009; 34: 996-1009.
8. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005; 106:3020-3027.
9. DiPersio JF, Micallef I, Stiff PJ, Bolwell BJ, Maziarz RT, Angell J, Bridger G, Calandra G. A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Comparative Trial of AMD3100 (Plerixafor) + G-CSF vs. Placebo + G-CSF in Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) Patients for Autologous Hematopoietic Stem Cell (aHSC) Transplantation. *Blood* 2007; 110: 601.
10. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee AP, Stiff P, Micallef I, Angell J, Bridger G, Calandra G. A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Comparative Trial of AMD3100 (Plerixafor) + G-CSF vs. G-CSF + Placebo for Mobilization in Multiple Myeloma (MM) Patients for Autologous Hematopoietic Stem Cell (aHSC) Transplantation. *Blood* 2007; 110: 445.
11. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 1998; 4: 72-77.
12. Pelus LM, Fukuda S. Chemokine- mobilized adult stem cells, defining a better hematopoietic graft. *Leukemia* 2008; 22: 466-473.
13. Pusic I, DiPersio JF. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Design* 2008; 14: 1950-1961.
14. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996; 5: 213-226.
15. Levering WHBM, Preijers FWMB, van Wieringen WN, Kraan J, van Beers WAM, Sintnicolaas K, van Rhenen DJ, Gratama JW. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration lessons from nine years external duality assessment within the Benelux Countries. *Cytometry B* 2007; 72B: 178-188.
16. DiPersio JF, Smith A, Sempek D, Baker A, Jiang S, Vij R, Cashen A, Westervelt P. Kinetics of autologous stem cell mobilization failure: comparison of AMD3100/G-CSF, G-CSF, GM-/G-CSF, and chemotherapy/G-CSF on remobilization success. *Blood* 2006; 108: 3380.
17. Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, Klekar A, Al-Olama A, Keating C, O'Connor C, Berkman E, Erban JK, Sprague KA, Miller KB, Schenkein DP. Randomized trial of filgrastim versus

- chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. *Blood* 2001; 98: 2059-2064.
18. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR Jr, Hertenstein B, Klein JP, Montserrat E, Zhang MJ, Ringdén O, Tomany SC, Rowlings PA, Van Hoef ME, Gratwohl A. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR histocompatibility and stem cell sources working committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; 95: 3702-3709.
  19. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, Bredeson C, Hubesch L, Howson-Jan K, Shore TB, Walker IR, Browett P, Messner HA, Panzarella T, Lipton JH. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; 100: 1525-1531.
  20. Watt SM, Forde SP. The central role of the chemokine receptor, CXCR4, in the haematopoietic stem cell transplantation: will CXCR4 antagonists contribute to the treatment of blood disorders? *Vox Sanguinis* 2008; 94: 18-32.
  21. Levesque JP, Winkler I. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 53-58.
  22. DiPersio JF, Smith A, Sempek D, Baker A, Jiang S, Vij R, Cashen A, Westervelt P. Impact of disease and mobilizing agents on initial and remobilization failure. *Blood* 2006; 108: 5222.
  23. Pusic I, Jiang SY, Landua S, Uy GL, Rettig MP, Cashen AF, Westervelt P, Vij R, Abboud CN, Stockerl-Goldstein KE, Sempek DS, Smith AL, DiPersio JF. Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1045-1056.
  24. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stroma cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 973-981.
  25. Miller JP, Perry EH, Price TH, Bolan CD, Karanes C, Boyd TM, Chitphakdithai P, Jing RJ. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 29-36.
  26. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40: 373-383.
  27. Seggewiss R, Buss EC, Herrmann D, Goldschmidt H, Ho AH, Fruehauf S. Kinetics of peripheral blood stem cell mobilization following G-CSF supported chemotherapy. *Stem Cells* 2003; 21: 568-574.
  28. Drake M, Ranaghan L, Morris TC, Nolan L, Desai ZR, Irvine AE, Jordan A, Magill K, Price S. Analysis of the effect of prior therapy on progenitor cell yield: use of a chemotherapy scoring system. *Br J Haematol* 1997; 98: 745-749.
  29. Laszlo D, Galieni P, Raspadori D, Scalia G, Bigazzi C, Bocchia M, Bucalossi A, Marotta G, Tozzi M, Lauria F. Fludarabine containing-regimens may adversely affect peripheral blood stem cell collection in low-grade non Hodgkin lymphoma patients. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 157-161.
  30. Tournilhac O, Cazin B, Leprêtre S, Divinè M, Maloum K, Delmer A, Grosbois B, Feugier P, Maloisel F, Villard F, Villemagne B, Bastit D, Belhadj K, Azar N, Michallet M, Manhès G, Travade P. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 103: 363-365.

31. Flinn IW, Byrd JC, Morrison C, Jamison J, Diehl LF, Murphy T, Piantadosi S, Seifter E, Ambinder RF, Vogelsang G, Grever MR. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancies. *Blood* 2000; 96: 71-75.
32. Michallet M, Thiébaud A, Dreger P, Remes K, Milpied N, Santini G, Hamon M, Björkstrand B, Kimby E, Belhabri A, Tanguy ML, Apperley JF. Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization and transplantation after fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a report of the European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) CLL subcommittee on behalf of the EBMT Chronic Leukaemias Working Party (CLWP). *Br J Haematol* 2000; 108: 595-601.
33. Boeve S, Strupeck J, Creech S, Stiff PJ. Analysis of remobilization success in patients undergoing autologous stem cell transplants who fail an initial mobilization: risk factors, cytokine use and cost. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 997-1003.
34. Vasu S, Leitman SF, Tisdale JF, Hsieh MH, Childs RW, Barrett AJ, Fowler DH, Bishop MR, Kang EM, Malech HL, Dunbar CE, Khuu HM, Wesley R, Yau YY, Bolan CD. Donor demographic and laboratory predictors of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in an ethnically diverse population. *Blood* 2008; 112: 2092-2100.
35. Ings SJ, Balsa C, Leverett D, Mackinnon S, Linch DC, Watts MJ. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilized with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used. *Br J Haematol* 2006; 134: 517-525.
36. Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, Watanabe H, Okamoto Y, Onishi T, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y. Factors associated with granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors. *Vox Sang* 2005; 89: 229-235.
37. Tomblyn M, Gordon Li, Singhal S, Galoman MS, Williams S, Winter JN, Evens A, Mehta J. Use of total leukocyte and platelet counts to guide stem cell apheresis in healthy allogeneic donors treated with G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 663-666.
38. De la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, del Cañizo C, Brunet S, Zamora C, Díaz MA, Bargay J, Petit J, de la Serna J, Insunza A, Arrieta R, Pascual MJ, Serrano D, Sanjuan I, Espigado I, Alegre A, Martínez D, Verdeguer A, Martínez C, Benlloch L, Sanz MA. Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors. *Transfusion* 2002; 42: 4-9.
39. Wiesneth M, Schreiner T, Friedrich W, Bunjes D, Duncker C, Krug E, Maccari B, Müller S, Nowak S, Kubanek B. Mobilization and collection of allogeneic peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (Suppl. 3): S21-S24.
40. Lysák D, Koza V, Jindra P. Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. *Transfusion and apheresis science* 2005; 33: 275-283.
41. Mifflin G, Charley C, Stainer C, Anderson S, Hunter A, Russel N. Stem cell mobilization in normal donors for allogeneic transplantation: analysis of safety and factors affecting efficacy. *Br J Haematol* 1996; 95: 345-348.
42. Anderlini P, Przepiorka D, Lauppe J, Seong D, Giral S, Champlin R, Körbling M. Collection of peripheral blood stem cells from normal donors 60 years of age or older. *Br J Haematol* 1997; 97: 485-487.
43. Arbona C, Prosper F, Benet I, Mena F, Solano C, Garcia-Conde J. Comparison between once a day vs. twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBSC) in normal donors for allogeneic PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 39-45.
44. Tabilio A, Falzetti F, Giannoni C, Aversa F, Martelli MP, Rosetti M, Caputo P, Chionne F, Gambelungho C, Martelli MF. Stem cell mobilization in normal donors. *J Hematother* 1997; 6: 227-234.

45. Morris C, Siegel E, Barlogie B, Cottler-Fox M, Lin P, Fassas A, Zangari M, Anaissie E, Tricot G. Mobilization of CD34+ cells in elderly patients (>= 70 years) with multiple myeloma: influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen. *Br J Haematol* 2003; 120: 413-423.
46. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony- stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 1995; 86: 4437-4445.
47. Tanaka R, Matsudaira T, Aizawa J, Ebihara Y, Muraoka K, Tsuji K, Ikebuchi K, Kodama K, Tanaku F, Nakahata T. Characterization of peripheral blood progenitor cells (PBSC) mobilized by filgrastim (rHuG-CSF) in normal volunteers: dose- effect relationship for filgrastim with the character of mobilized PBSC. *Br J Haematol* 1996; 92: 795-803.
48. Stroncek DF, Clay ME, Herr G, Smith J, Jaszcz WB, Ilstrup S, McCullough J. The kinetics of G-CSF mobilization of CD34+ cells in healthy people. *Transf Med* 1997; 7: 19-24.
49. Rowley SD, Donaldson G, Lilleby K, Bensinger WI, Appelbaum FR. Experiences of donors enrolled in a randomized study of allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 2541-2548.
50. Ghada A, Guthrie KA, Sorrow ML, Linenberger M. Apheresis safety and product yield among elderly donors for allogeneic sibling hematopoietic cell transplantation (HCT). *Blood* 2006; 108: 5223.
51. Confer D, Miller JP. Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. *Br J Haematol* 2006; 137: 77-78.
52. Tigue CC, Trifilio SM, Tallman MS, Goldman JM, Bennett CL. Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration: response to Confer & Miller and Bache & Zander. *Br J Haematol* 2007; 137: 79-80.
53. Grupp SA, Frangoul H, Wall D, Pulsipher MA, Levine JE, Schultz KR. Use of G-CSF in matched sibling donor pediatric allogeneic transplantation: a consensus statement from the Children's Oncology Group (COG) transplant discipline committee and Pediatric Blood and Marrow transplant Consortium (PBMTTC) executive committee. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:414-421.
54. Lysák D, Navrátilová J. G-CSF u zdravých dárců. Bezpečný nebo škodlivý ? *Trans Hemat dnes* 2007; 13: 148-152.
55. Hasenclever D, Sextro M. Safety of AlloPBPC donors: biometrical considerations on monitoring long term risks. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: S28-S30.
56. Südhoff T, Söhngen D. Circulating endothelial adhesion molecules (sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) during rHuG-CSF-stimulated stem cell mobilization. *J Hematother* 2002; 11: 147 – 151.
57. Carstanjen D, Ulbricht N, Iacone A, Regenfus M, Salama A. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF. *Transfusion* 2002; 42: 588-596.
58. Li CX, Wu DP, Chang WR, Zhu HT, Cen JN, Zhang XG. Dynamics changes of cytokines in G-CSF mobilized peripheral blood. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2003; 24: 398-401.
59. Carstanjen D, Regenfus M, Müller C, Salama A. Interleukin-6 is a major effector molecule of short-term G-CSF treatment inducing bone metabolism and an acute- phase response. *Exp Hematol* 2001; 29: 812-821.
60. Dosquet Ch, Chen Y, Makke J, Miclea JM, Coudert MC, Marolleau JP, Femand JP, Cottu P, Lotz JP, Benbunan M. Cytokines and vascular adhesion molecule-1 in the blood of patients undergoing HPC mobilization. *Transfusion* 2001; 41: 206 – 212.



61. Da WM, Zhang M, Zhang BL, Jin HJ, Yu L, Han XP, Jing Y, Zhao Y, Wu XX, Huang WR, Wang QS. Change of adhesion molecule expression on CD34(+) cells from bone marrow and peripheral blood during mobilization with combination of chemotherapy and G-CSF. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2002; 10: 240-242.
62. Bellucci R, De Propriis MS, Buccisano F, Lisci A, Leone G, Tabilio A, de Fabritiis P. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1-8.
63. Gazitt Y, Shaughnessy P, Liu Q. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells in peripheral blood of non- Hodgkin's lymphoma patients mobilized with different growth factors. *Stem Cells* 2001; 19: 134-143.
64. Zeller W, Kröger N, Berger J, Krueger W, Dierlamm J, Stockschräder M, Gutensohn K, Hossfeld DK, Zander AR. Expression of the adhesion molecules CD49d and CD49e on G-CSF- mobilized CD34+ cells of patients with solid tumors or non- Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma and of healthy donors is inversely correlated with the amount of mobilized CVD34+ cells. *J Hematother Stem Cell Res* 1999; 8: 539-546.
65. Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: S29-S33.
66. Waller CF, Bertz H, Wenger MK, Fetscher S, Hardung M, Engelhardt M, Behringer D, Lange W, Mertelsmann R, Finke J. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: efficacy and toxicity of a high-dose rh-G-CSF regiment. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 279-283.
67. Stiff P, Malhotra D, Bayer R. High dose G-CSF improves stem cell mobilization and collection compared to standard dose in patients with ovarian cancer which leads to a decrease in delayed platelet engraftment following stem cell transplants. *Blood* 1997; 90: 591a.
68. Tournilhac O, Cazin B, Leprêtre S, Diviné M, Maloum K, Delmer A, Grosbois B, Feugier P, Maloysel F, Villard F, Villemagne B, Bastit D, Belhadj K, Azar N, Michallet M, Manhès G, Travade P. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004; 103: 363-365
69. Montillo M, Tedeschi A, Rossi V, Cairoli R, Pungolino E, Intropido L, Cafro AM, D'Avanzo G, Farioli R, Brando B, Scarpati B, Veronese S, Morra E. Successful CD 34+ cell mobilization by intermediate dose Ara-c in chronic lymphocytic leukemia patients treated with sequential fludarabine and Campath-1H. *Leukemia*. 2004; 18: 57-62
70. Rock G, Chin-Yee I, Cantin G, Giulivi A, Gluck S, Keating A, Keeny M, Klassen J, Sutherland R. Quality assurance of progenitor cell content of apheresis products: a comparison of clonogenic assays and CD34+ enumeration. *The Canadian Apheresis Group and Canadian Bone Marrow. Transfus Med* 2000; 10: 67-75.
71. Lysák D, Navrátilová J, Koza V. Comparison of CD34+ enumeration results in unrelated peripheral stem cells products between collection and transplant centers. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S128.

## 11. Přehled publikační činnosti autora

### Původní články

1. **Lysák D**, Koza V, Jindra P, Vozobulová V, Schutzová M, Fiser J, Černá K, Karas M, Škopek P, Švojgrová M, Vokurka S. Allogeneic BMT in patients above 45 years of age: a single center experience, *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27: 723-726. **IF 3,0**, citace 2.
2. Jindra P, Koza V, Boudová L, Vozobulová V, Černá K, Karas M, **Lysák D**, Švojgrová M. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder in CLL patients after treatment with fludarabin and cyclophosphamide followed by high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2003; 31: 951-952. **IF 3,0**.
3. Cetkovský P, Schutzová M, Jindra P, Škopek P, Pittrová H, Vozobulová V, Švojgrová M, Navrátilová J, **Lysák D**, Vokurka S, Fišer J, Černá K, Karas M, Koza V. Mobilizace kmenových buněk krvetvorby u nemocných se zhoubnými nádory varlat před plánovanou léčbou vysokými dávkami chemoterapie. *Klinická onkologie* 1999; 12: 97-100.
4. Jindra P, Koza V, **Lysák D**, Vozobulová V, Steinerová K. Inefficiency of high-dose G-CSF alone as second mobilization regimen in fludarabin-cyclophosphamide-treated CLL patients who failed to mobilize after chemotherapy and G-CSF. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35: 729-730. **IF 3,0**, citace 2.
5. **Lysák D**, Koza V, Steinerová K, Jindra P, Vozobulová V, Schutzová M. Mobilization of peripheral blood stem cells in CLL patients after front-line fludarabine treatment. *Annals of Hematology* 2005; 84: 456-461. **IF 2,34**, citace 5.
6. **Lysák D**, Koza V, Jindra P. Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. *Transfusion and apheresis science* 2005; 33: 275-283. **IF 0,97**, citace 12.
7. Klabusay M, **Lysák D**, Hrabčáková V, Navrátil M, Coupek P, Mayer J. Effect of growth factor on the phenotype of subpopulations and on the kinetics of CD34+ cells in the peripheral blood and in grafts of peripheral stem cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma indicated for autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Cas Lek Cesk* 2008; 147: 319-324.

### Abstrakta ve sbornících

8. Vokurka S, **Lysák D**, Fišer J, Jindra P. Vysocedávkovaná chemoterapie (BEAM) a autologní transplantací imunoselektovaných CD34+ buněk jako léčba první linie u nemocných s mantle cell NHL s postižením kostní dřeně. XI. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 27.
9. **Lysák D**, Fišer J, Vokurka S, Koza V. Periferní progenitorové buňky (PBSC) v období reparační krvetvorby po autologní transplantaci. XI. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 23.
10. **Lysák D**, Koza V, Jindra P, Černá K, Boudová L. Kombinované vyšetření kostní dřeně u B-CLL pomocí morfologie, průtokové cytometrie a molekulární genetiky. XV. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 171.
11. **Lysák D**, Koza V, Černá K, Jindra P. Exprese CD38 u chronické lymfatické leukémie. XV. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 107.
12. Karas M, Koza V, Jindra P, Černá K, Škopek P, **Lysák D**, Švojgrová M, Vozobulová V. Ph pozitivní akutní lymfoblastická leukémie dospělých a zkušenosti s alogenní transplantací těchto nemocných na hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň. XV. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 163.
13. Koza V, Jindra P, Švojgrová M, Škopek P, Vozobulová V, Pittrová H, Schutzová M, Navrátilová J, Černá K, Karas M, **Lysák D**, Vokurka S. Přehled a výsledky transplantací krvetvorných buněk na HOO FN v Plzni za posledních 10 let. XV. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 23.

14. Koza V, Jindra P, Švojgrová M, Škopek P, Vozobulová V, Pittrová H, Schutzová M, Navrátilová J, Černá K, Karas M, **Lysák D**, Vokurka S. Výsledky nepřibuzenských transplantací na Hematologicko-onkologickém oddělení FN v Plzni na HOO FN v Plzni v letech 1993- 2000. XV. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 25.
15. Koza V, Jindra P, Vozobulová V, Černá K, **Lysák D**, Škopek P, Švojgrová M. Combination fludarabin and cyclophosphamide (F+C) chemotherapy is associated with severe and prolonged impairment of peripheral blood progenitor cells (PBSC) mobilization and collection. Bone Marrow Transplantation 2000; 25, Suppl. 1: S97.
16. Koza V, Vozobulová V, Jindra P, **Lysák L**, Škopek P, Karas M, Brychtová Y, Fraňková H, Gaja A, Gumulec J, Heinzová V, Kessler P, Pytlík R, Řezníček J, Vaštová S, Walterová L, Živná J. CLL léčená fludarabinem (FLU) a cyclophosphamidem (CY). XV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. 108.
17. Koza V, Vozobulová V, Jindra P, Černá K, Škopek P, Karas M, Švojgrová M, **Lysák D**, Brychtová Y, Gaja A, Gumulec J, Hausdorf P, Heinzová V, Kessler P, Pytlík R, Řezníček J, Walterová L, Živná J. Fludarabine plus cyclophosphamide (F+Cy) of F+Cy plus autologous transplantation (Tx) in the treatment of CLL patients. Bone Marrow Transplantation 2002; 29, Suppl. 2: S160.
18. Koza V, Vozobulová V, Černá K, Jindra P, **Lysák D**, Škopek P, Karas M, Gumulec J, Hausdorf P, Kessler P. CLL s rizikovými faktory léčená Fludarabinem + Cyklofosfamidem (F+CY) nebo F+CY+ABMT. XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. 68.
19. Koza V, Jindra P, **Lysák D**, Škopek P, Cetkovský P. Peripheral blood progenitor cells (PBSC) mobilized at the time of hematopoietic reconstitution after autologous transplantation. Bone Marrow Transplantation 1999; 23, Suppl. 1: S677.
20. Vokurka S, Koza V, Jindra P, Vozobulová V, Schutzová M, **Lysák D**, Karas M, Černá K, Švojgrová M. Efekt imunoterapie anti-CD20 (Mabthera) v léčbě pacientů s mantle cell lymfomem. XIII. český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. P/138.
21. **Lysák D**, Vozobulová V, Koza V. Mobilizace hemopoetických progenitorových buněk u nemocných s CLL po léčbě Fludarabinem. XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. 71.
22. Jindra P, Koza V, Černá K, **Lysák D**, Karas M, Vozobulová V, Vokurka S, Škopek P, Schutzová M, Švojgrová M. PTCL i DLBCL mají stejnou prognózu je-li aplikována vysocedávkovaná chemoterapie (HDT) s autologní transplantací krvetvorných buněk (ASCT). XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. 100.
23. **Lysák D**, Černá K, Vokurka S, Koza V. Age-related differences in healthy donors PBSC mobilization. A single centre experience. Bone Marrow Transplantation 2004; 33, Suppl. 1: S339.
24. Vokurka S, Koza V, Jindra P, Černá K, Karvudinis T, **Lysák D**, Bystrická E, Volfová A, Novák L. Outcomes of core and extended family donor searches – a single-centre experience. Bone Marrow Transplantation 2004; 33, Suppl. 1: S133.
25. Jindra P, Koza V, Karas M, Černá K, **Lysák D**, Vozobulová V, Schutzová M, Škopek P, Vokurka S, Švojgrová M. Conventional versus reduced intensity-conditioned allogeneic stem cell transplantation for CLL – single-centre comparison of early outcome. Bone Marrow Transplantation 2004; 33, Suppl. 1: S148.
26. Steinerová K, Koza V, **Lysák D**, Jindra P, Karas M, Škopek P, Vokurka S. High percentage of CD34 positive cells in peripheral blood after chemotherapy correlate with high relapse rate in AML patients. Single-centre experience. Bone Marrow Transplantation 2004; 33, Suppl. 1: S240.

27. Steinerova K, Koza V, Jindra P, **Lysak D**, Varvarovska B. The history and future of data collection and data flow. Single- centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33, Suppl. 1: S258.
28. Karas M, Koza V, Jindra P, Cerna K, Schutzova M, Skopek P, **Lysak D**, Vozobulova V, Vokurka S, Svojgrova M, Svoboda T. Long-term outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in 1. PR treated with autologous transplantation and comparison with DLBCL patients in 1. CR treated identically. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33, Suppl 1: S350.
29. Karas M, Jindra P, Koza V, Černá K, Škopek P, Vokurka S, **Lysak D**, Švojgrová M, Vozobulová V, Schutzová M. Alogenní transplantace po redukované přípravě u nemocných s AML mimo 1. CR - zkušenosti HOO FN Plzeň. XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt s. 11.
30. **Lysak D**, Schutzová M, Koza V. Hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma. ISCT 2004, Sborník abstrakt s. 14.
31. Vokurka S, Koza V, Jindra P, **Lysak D**, Škopek P, Steinerová K, Karas M. Analýza odběrů hematopoetických buněk a souvisejících komplikací u příbuzenských dárců v průběhu 10 let-zkušenosti plzeňského odběrového centra. XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Sborník abstrakt P4.
32. **Lysak D**, Navrátilová J, Koza V. Comparison of CD34+ enumeration results in unrelated peripheral stem cells products between collection and transplant centres. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S128.
33. Steinerova K, Koza V, Jindra P, Karas M, **Lysak D**, Vokurka S, Vozobulova V, Schutzova M, Svoboda T. Low transplant related mortality after allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients over 60 years in comparison with patients under 60 years. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S197.
34. Karas M, Koza V, Jindra P, Steinerova K, Vokurka S, **Lysak D**, Vozobulova V. Reduced- intensity transplantation can improve the prognosis of elderly patients or patients with serious comorbidities with high-risk or advanced AML-single centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S222.
35. Jindra P, Koza V, Steinerova K, **Lysak D**, Karas M, Vozobulova V, Vokurka S. Comparison of early outcome of CLL patients allotransplanted with conventional or reduced-intensity conditioning: age is no longer a barrier when using reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S234.
36. Jindra P, Koza V, Steinerova K, **Lysak D**, Vozobulova V, Schutzova M, Karas M, Svojgrova M. Comparison of outcome of peripheral T-cell lymphoma, unspecified versus T-anaplastic large cell lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: could this bring the survival curves closer together? *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, Supp 2: S245.
37. **Lysak D**. Monitorace CMV specifických T-lymfocytů po alogenní transplantaci hemopoetických progenitorových buněk pomocí tetramer technologie. Konference analytická cytometrie III., 2005, Sborník abstrakt s. 90.
38. **Lysak D**. Stanovení reziduálních leukocytů v trombokoncentrátu průtokovou cytometrií. Konference analytická cytometrie III., 2005, Sborník abstrakt s. 91.
39. **Lysak D**, Steinerová K, Jindra P, Koza V. Monitoring of cytomegalovirus- specific immune recovery in recipient of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37, Suppl 1: S172.
40. Steinerová K, Koza V, Jindra P, Karas M, **Lysak D**, Vokurka S, Svoboda T, Vozobulova V, Schulzova M. Secondary malignancies following high- dose chemotherapy and autologous stem

- cell transplantation. Single centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37, Suppl 1: S108.
41. Karas M, Koza V, Jindra P, Steinerova K, **Lysák D**, Vokurka S, Vozobulova V, Svoboda T. Reduced-intensity transplantation for elderly patients or patients with comorbidities with high-risk or advanced AML and comparison with myeloablative transplantation: a single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37, Suppl 1: S124.
  42. **Lysák D**, Vozobulová V, Steinerová K, Koza V. Kinetika chimerismu a reziduální nemoci u pacientů s CLL po nemyeloablativní alogenní transplantaci. XX. Olomoucké hematologické dny, Sborník abstrakt s. 61.
  43. Koza V, Steinerova K, **Lysák D**, Vokurka S, Karas M. Long-term follow-up of a subgroup of peripheral T-cell lymphomas unspecified treated with and without autoSCT. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39, Suppl 1: S148.
  44. Karas M, Koza V, Jindra P, Steinerová K, **Lysák D**, Vozobulová V, Svoboda T. reduced-intensity transplantation in patients older than 60 years of age with high-risk or advanced acute myeloid leukaemia – a single centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39, Suppl 1: S300.
  45. Steinerová K, Koza V, Jindra P, Karas M, **Lysák D**, Vokurka S, Svoboda T, Vozobulová V. Comparison of patients with acute lymphoblastic leukaemia after related and unrelated stem cell transplantation. Single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39, Suppl 1: S314.
  46. Steinerová K, Koza V, Jindra P, Karas M, Svoboda T, **Lysák D**, Vokurka S, Vozobulová V. Outcomes of patients with high-risk acute myeloid leukaemia relapsed after allogeneic stem cell transplantation. Single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41, Suppl. 1: S116.
  47. Jindra P, Karas M, Steinerová K, **Lysák D**, Vokurka S, Svoboda T, Koza V. Unrelated HSCT in high/intermediate-risk haematological patients above 50 years: comparable outcomes both with fully molecularly (10/10) matched and mismatched (8-9/10) donors. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41, Suppl. 1: S199.
  48. Vokurka S, Koza V, Jindra P, Steinerová K, Karas M, **Lysák D**, Svoboda T. Autologous stem cell transplantation as a first-line therapy prolongs progression-free survival in mantle cell lymphoma. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41, Suppl. 1: S247.
  49. Karas M, Koza V, Jindra P, Steinerová K, **Lysák D**, Svoboda T. Reduced-intensity transplantation and early withdrawal of immunosuppression in patients with advanced acute myeloid leukaemia – single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41, Suppl. 1: S424.
  50. **Lysák D**, Jindra P, Jungová A, Karas M, Svoboda T. Kinetics of cytomegalovirus specific immune response in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Cytotherapy* 2008; Suppl 1: S202.
  51. Karas M, Koza V, Steinerová K, Jindra P, **Lysák D**, Svoboda T. Transplantace po redukované přípravě s nepříbuzným dárce u pacientů nad 50 let s prognosticky nepříznivou AML – srovnání výsledků s pacienty transplantovanými příbuzným dárce. *Vnitř Lék* 2008; 54, příloha 5, P31.
  52. **Lysák D**, Vozobulová V, Jungová A, Svoboda T, Vokurka S, Jindra P, Steinerová K, Karas M, Koza V. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) for chronic lymphocytic leukemia. *Vnitř Lék* 2008; 54, příloha 5, P58.
  53. **Lysák D**, Jungová A, Vrzalová J, Holubec L, Koza V. Correlation of cytokines levels and adhesion molecules expression with stem cell mobilization efficacy in healthy donors. *Blood* 2008; 112: 1189.

### **Přehledové články**

1. Mírka H, Ferda J, Ohlidalová K, Vokurka S, Karas M, Jindra P, **Lysák D**, Mukenšnabl P. Význam HRCT v diagnostice invazivní plicní aspergilozy u nemocných a hematologickými malignitami. Česká radiologie 2006; 6: 412- 418.
2. **Lysák D**, Navrátilová J. G-CSF u zdravých dárců. Bezpečný nebo škodlivý? Trans Hemat dnes 2007; 13: 149-153.

### **Přednášky na odborných setkáních**

1. **Lysák D**. FACS – Indikujeme racionálně? Koho, kdy a jak vyšetřovat a co nám vyšetření může přinést. XV. seminář EDIPO, 2004, přednáška.
2. **Lysák D**. Some aspects of stem cell collection and transplantation- a single centre experience. Aktualnye vaprosy hematologii i transfuziologii. Sankt-Peterburk, 2004, přednáška.
3. **Lysák D**. Chronická lymfatická leukémie – diagnostika, léčba, monitorace. Setkání uživatelů Beckman Coulter 2005, přednáška.
4. **Lysák D**. Odběry hemopoetických progenitorových buněk u nepříbuzných dárců. Seminář Nové postupy v dárcovských a terapeutických hemaferézách, 2005, přednáška.
5. **Lysák D**. Technologia tetramerov i transplantacia. Seminář hematologie a průtokové cytometrie, Beckman Coulter, Moskva, 2006, přednáška.
6. **Lysák D**. Alogenní transplantace hemopoetických progenitorových buněk. Setkání uživatelů Beckman Coulter, 2006, přednáška.
7. **Lysák D**. The role of flow cytometry in the management of chronic lymphocytic leukemia. Seminář průtokové cytometrie Beckman Coulter, Moskva 2007, přednáška.
8. **Lysák D**. Průtoková cytometrie v hemato – onkologii. XXVIII. Imunoanalytické dny, 2007, vyzvaná přednáška.
9. **Lysák D**, Hrabětová M. Odběry dárců vyššího věku. XIX. seminář EDIPO, 2007, přednáška.
10. **Lysák D**. Současné možnosti netransplantační léčby a role SCT u mnohočetného myelomu. XX. seminář EDIPO, 2007, přednáška.
11. **Lysák D**. CMV specifické T- lymfocyty po alogenní transplantaci hemopoetických progenitorových buněk. 3. Motolský minikurz cytometrie, 2007, přednáška.
12. **Lysák D**, Gašová Z, Kořístek Z, Skoumalová P. Vliv věku na mobilizaci alogenních dárců PBSC. Seminář dárcovské a terapeutické hemaferozy, 2007, přednáška.
13. **Lysák D**. Pegfilgrastim při intenzivní léčbě akutní myeloidní leukémie. XXII. Olomoucké hematologické dny, satelitní sympozium společnosti Amen, přednáška.
14. **Lysák D**. (Ne)Bezpečnost podávání růstových faktorů. XXII. Seminář EDIPO 2008, přednáška.
15. **Lysák D**. Imunoterapie na scéně aneb protilátky nejsou jen pro diagnostiku. Setkání uživatelů Coulter 2008, přednáška.
16. **Lysák D**, Jindra P, Jungová A, Karas M, Steinerová K, Koza V. Monitorace specifické CMV imunity: využití pro klinickou praxi. Konference „Infekce po transplantaci ledviny a jejich dopad na dlouhodobé výsledky“, 2008, přednáška.