

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Mobilizace hemopoetických progenitorových buněk z periferní krve

Daniel Lysák

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:

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

Předmluva

Periferní kmenové buňky jsou v současné době hlavním zdrojem hemopoetických kmenových buněk pro účely autologních i alogenních transplantací. Mobilizace a odběr těchto transplantátů se týká řady pacientů s hemato-onkologickými onemocněními a také zdravých dárců příbuzných i nepříbuzných. Optimalizace procedury mobilizace a odběru ve smyslu dosažení maximální efektivity při zachování co nejmenší zátěže a rizika pro pacienta či dárce je dlouhodobým úkolem. V posledních letech se výrazně rozšířily naše znalosti o mechanismech osídlení a mobilizace kmenových buněk z kostní dřeně, což nám dává možnost zlepšovat naše mobilizační postupy a péči o pacienty resp. dárce.

Obsah

Titulní strana	1
Předmluva	2
Obsah	3
Seznam zkratk	6
1. Úvod do problematiky	7
1.1. Transplantace periferních kmenových buněk	7
1.1.1. Transplantace HPC	7
1.1.2. Zdroje kmenových buněk	7
1.1.3. Optimální dávka CD34+ buněk pro transplantaci	8
1.2. Mechanismus mobilizace	8
1.2.1. Biologie a mechanismy mobilizace HPC	8
1.2.2. Mikroprostředí kostní dřeně	9
1.2.3. Mobilizace a homing	10
1.2.4. Centrální role CXCR4/SDF-1 α interakce	11
1.2.5. Ostatní adhezivní interakce	12
1.2.6. Nepřímá mobilizace pomocí G-CSF	13
1.2.7. Přímá mobilizace (CXCR4)	14
1.3. Ostatní mobilizační preparáty	16
1.4. Kvantifikace CD34+ buněk	17
1.5. Mobilizace HPC pro autologní transplantaci (pacienti)	18
1.5.1. Mobilizační schémata	18
1.6. Mobilizace HPC pro alogenní transplantaci (zdraví dárce)	19
1.6.1. Mobilizační schémata	19
1.6.2. Vztah mobilizace a kompozice transplantátu	19
1.7. Faktory ovlivňující a předikující výsledek mobilizace	20
1.8. Špatně mobilizovatelní pacienti a dárce („poor mobilizers“)	20
1.9. Remobilizace	20
1.10. Komplikace mobilizace	21
1.10.1. Časné komplikace	21
1.10.2. Pozdní komplikace	22

1.11. Komplikace aferézy	22
2. Cíle disertační práce	23
3. Metody a soubory pacientů	24
3.1. Pacienti	24
3.1.1. CLL pacienti	24
3.1.2. MM pacienti	25
3.2. Zdraví dárce	26
3.2.1. Stanovení CD34+ buněk a adhezivních molekul	27
3.2.2. Stanovení cytokinů	28
3.3. Statistické hodnocení	29
4. Výsledky	30
4.1. Úvod.	30
4.2. Mobilizace HPC kombinací chemoterapie a G-CSF u pacientů s CLL	30
4.2.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk	30
4.2.2. Aferézní produkt	31
4.2.3. Remobilizace	32
4.3. Mobilizace HPC kombinací chemoterapie a G-CSF u pacientů s MM	32
4.3.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk	32
4.3.2. Aferézní produkt	33
4.4. Mobilizace zdravých dárců pomocí G-CSF	33
4.4.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk	33
4.4.2. Aferézní produkt	34
4.4.3. Nežádoucí účinky stimulace a aferezy u zdravých dárců	36
4.4.4. Kinetika cytokinů při G-CSF mobilizaci	36
4.4.5. Prediktivní význam cytokinů	37
4.4.6. Adhezivní molekuly na CD34+ buňkách	38
4.5. Kontrola kvality transplantátu	38

5. Diskuse	40
5.1. Faktory ovlivňující efektivitu mobilizace u pacientů	40
5.2. Faktory ovlivňující efektivitu mobilizace u dárců	41
5.3. Vliv věku dárce na efektivitu mobilizace	42
5.4. Kinetika CD34+ buněk při mobilizaci	44
5.5. Nežádoucí účinky mobilizace G-CSF a aferézy	44
5.6. Pozdní účinky mobilizace G-CSF u zdravých dárců	46
5.7. Prediktivní význam cytokinů	47
5.8. Prediktivní význam adhezivních molekul	48
5.9. Remobilizace	49
5.10. Variabilita měření CD34+ buněk mezi centry	50
5.11. Postup u „poor mobilizers“	51
5.12. Mobilizace v regenerativní medicíně	52
6. Závěry	54
7. Poděkování	56
8. Použitá literatura	57
9. Přílohy	71
9.1. Tabulky	71
9.2. Grafy	77
9.3. Obrázky	93

Seznam zkratk

ACD-A	antikoagulační roztok na bázi citrátu
BM	kostní dřeň
CG	cathepsin G
CFU	kolonie formující jednotka („colony forming unit“)
CLL	chronická lymfatická leukémie
CXCL12	„stromal cell-derived factor 1 α “ (SDF-1 α)
CXCR4	chemokinový receptor 4 (CD184)
EBMT	Evropská skupina pro transplantaci kostní dřeně
ECM	extracelulární matrix
G-CSF	růstový faktor granulopoezy (filgrastim)
GFP	„green fluorescence protein“
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli („graft versus host disease“)
Hb	hemoglobin
HLA	hlavní histokompatibilní systém
HPC	hemopoetické progenitorové buňky
HSC	hemopoetické kmenové buňky
ICAM-1	„intracellular adhesion molecule“
ISHAGE	„International Society for Hematotherapy And Graft Engineering“
LFA-1	„leukocyte function-associated antigen-1“ (CD11a)
NMDP	„National Marrow Donor Program“
MM	mnohočetný myelom
MMP-9	„matrix metalloproteinase 9“
NE	neutrofilní elastáza
NHL	nehodgkinovský lymfom
PBSC	periferní kmenové buňky („peripheral blood stem cells“)
SCF	„stem cell factor“
SDF-1α	„stromal cell-derived factor 1“ (CXCL12)
TBV	celkový objem krve („total blood volume“)
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1“
VLA-4	„very late antigen-4“ (CD49d)
WBC	leukocyty
WMDA	„World Marrow Donor Association“
DKMS	„Deutsche Knochenmarkspenderdatei“

1. Úvod do problematiky

1.1. Transplantace periferních kmenových buněk

1.1.1. Transplantace HPC

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). Po podání vysocedávkované chemoterapie nebo radioterapie mají transplantované kmenové krvetvorné buňky rekonstituovat nebo nahradit pacientův hemopoetický a imunitní systém.

1.1.2. Zdroje kmenových buněk

Hemopoetické kmenové buňky (HSC) jsou nezadané, nespécializované buňky schopné vlastní sebeobnovy a také diferenciaci do jednotlivých krvetvorných řad. HSC vytvářejí všechny buněčné linie hemopoetického systému včetně erytrocytů, trombocytů, myeloidních a lymfoidních buněk. Prvním krokem hematopoezy je diferenciaci HSC do hemopoetických progenitorových buněk (HPC), které se dále zadávají do jednotlivých krvetvorných linií. Hemopoetické kmenové buňky mohou být získány z kostní dřeně, pupečníkové krve nebo mobilizované periferní krve. Mobilizace HSC představuje jejich únik z kostní dřeně do periferní krve. Tento proces odpovídá fyziologickému uvolnění kmenových buněk z rezervoáru v kostní dřeni v reakci na stresové signály při poranění nebo zánětu.

Tradičním zdrojem hemopoetických kmenových resp. progenitorových buněk byla kostní dřeň. Pozorování, že v době rekonstituce krvetvorby po chemoterapii lze nalézt progenitorové buňky v periferní krvi pacientů, vedlo k myšlence, že kmenové buňky mohou být přinuceny opustit kostní dřeň a mohou být odebrány aferezou jako periferní kmenové buňky (PBSC) a klinicky využity. Odhalení této schopnosti HSC migrovat z kostní dřeně do periferní krve (mobilizace) a naopak se usazovat v kostní dřeni (homing) změnilo postupně klinickou praxi.

Počátky využití PBSC k rekonstituci hematopoezy po myeloablativní chemoterapii sahají do 80. let. Nejprve byla k mobilizaci HSC z kostní dřeně do periferní krve

využívána pouze chemoterapie. Koncem 90. let, se zavedením cytokinů do mobilizačních schémat, se staly hemopoetické kmenové buňky získané z periferní krve hlavním zdrojem autologních i alogenních transplantátů. 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). Zvyšuje se také podíl transplantací pupečnickové krve na celkovém počtu alogenních transplantací, který může v některých centrech představovat až 20 %.

Oproti kostní dřeni mají PBSC některé výhody. Především nabízejí vyšší dávku CD34+ buněk, rychlejší příhojení, zkrácení doby hospitalizace, potencionálně nižší riziko peritransplantačních komplikací, méně zatěžující metodu odběru atd.

1.1.3. Optimální dávka CD34+ buněk pro transplantaci

Hemopoetické kmenové/progenitorové 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 2×10^6 CD34+ buněk/kg hmotnosti pacienta. Dávka 5×10^6 /kg je pak dávkou optimální, která poskytuje rychlý a predikovatelný engraftment (1, 2). Dávka CD34+ buněk podaná při transplantaci ovlivňuje rychlost rekonstituce krevního obrazu (2, 3, 4) a také riziko komplikací plynoucích z pocytostatické pancytopenie (výskyt infekcí, délka hospitalizace, potřeba antibiotik, substitucí, růstových faktorů apod.). 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. Každopádně byla po alogenní transplantaci pozorována asociace nízké dávky CD34+ buněk ($< 1 \times 10^6$ /kg) se zvýšeným rizikem transplantační mortality a kratším přežitím (5).

1.2. Mechanismus mobilizace

1.2.1. Biologie a mechanismy mobilizace HPC

Za normálních okolností („steady state“) jsou hemopoetické kmenové buňky 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 osídlit kostní dřeně, kde dochází k jejich připojení a k obnově trilineární hematopoézy.

1.2.2. Mikroprostředí kostní dřeně

Hematopoéza je lokalizována do spongiosní kosti. Vyvíjející se hemopoetické buňky se nacházejí v kostní dřeni do doby jejich vyžránosti a uvolnění do cévního řečiště. 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 (osteoblastické), ve kterých jsou HSC v kontaktu s osteoblasty a endoteliální (vaskulární), v nichž jsou HSC v blízkosti vaskulárních sinusů (6).

Stěna vaskulárních sinusů sestává z jediné vrstvy endoteliálních buněk s nekompletní basální membránou. Skrze tyto sinusy vstupují nově formované HSC nebo zralé elementy do cirkulace. Na povrchu sinusů jsou dále adventiciální retikulární buňky mesenchymálního původu. Tyto buňky se větví do intertrabekulárního prostoru a vzájemným kontaktem spoluvytvářejí podporu pro vyvíjející se kmenové buňky (7). Při vstupování do mikrocirkulace tedy musí HSC pronikat skrze vaskulární bariéru sestávající z endoteliálních buněk, basální membrány a adventiciálních buněk.

Kostní kortex a trabekuly jsou potaženy endostálními buňkami jako jsou osteoblasty a osteoklasty, které přispívají k formování osteoblastických okrsků (7). Existuje těsný vztah mezi osteogenesou a hematopoézou a osteoblasty hrají důležitou roli nejen ve vývoji skeletu ale také v regulaci hematopoézy (8). Dochází k remodelaci kosti působením osteoklastů/ osteoblastů. Při (opakované) G-CSF stimulaci se zvyšuje počet osteoklastů, které zprostředkovávají kostní resorpci a uvolnění kalcia. Zároveň produkují interleukin 8 (IL-8) a matrix metalloproteinasu 9 (MMP-9), které plní své další funkce v procesu mobilizace (1).

Jednou z důležitých funkcí okrsků je také regulace rovnováhy mezi buněčnou sebeobnovou a diferenciací, především prostřednictvím kontroly asymetrického/

symetrického buněčného dělení. Při asymetrickém dělení zůstává jedna dceřiná buňka v okrsku jako buňka kmenová, zatímco druhá dceřiná buňka opouští okrsek, dále se dělí a diferencuje. Při symetrickém dělení se kmenová buňka rozdělí do dvou identických dceřiných buněk, které obě zůstávají v okrsku (9).

1.2.3. 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 velké množství nezralých a vyžívajících myeloidních a lymfoidních elementů s omezenou životností, které jsou dále uvolňovány do periferní krve. Pouze velmi malá část kmenových buněk je také vyplavována do cirkulace. Jejich fyziologickou rolí je pravděpodobně obnovovat místa poškozené kostní dřeni. Situace v okrscích kostní dřeni je tedy výrazně dynamická, je spojená s velkým obratem kmenových buněk a zahrnuje procesy uvolnění a migrace do cirkulace na straně jedné, homingu a reengraftmentu do kostní dřeni na straně druhé (10).

Oba typy okrsků – osteoblastické i vaskulární – hrají důležitou roli v regulaci mobilizace i návratu HSC zpět do kostní dřeni. Při mobilizaci opouštějí HSC osteoblastický okrsek, dostávají se do vaskulárního okrsku a vstupují mezi endoteliálními buňkami do cévního řečiště, zatímco zároveň vyžívají a diferencují (8). Homing je opakem tohoto procesu. HSC z periferní cirkulace migrují transendoteliálně do vaskulárního a nakonec zpět do osteoblastického okrsku. Transendoteliální migrace předpokládá degradaci bazální membrány a vyžaduje tedy produkci matrix- degradujících enzymů – především MMP-2 a MMP 9, které jsou uvolňovány různými buňkami (HSC, leukocyty, nádorové buňky atd.), viz obrázek 1. a 2. Homing je relativně rychlý proces trvající hodiny, maximálně 1 – 2 dny. Úspěšné osídlení lze v klinické situaci sledovat pomocí přihojení a rekonstituce hematopoiezy po transplantaci.

Vazba hemopoetických kmenových buněk v mikroprostředí kostní dřeni je zprostředkována celou řadou adhezivních a chemotaktických interakcí. Adhezivní molekuly (zejména integriny – VLA-4, VLA-5 a selektiny) zprostředkovávají přiblížení a adhezi přihojujících se progenitorů k cévní stěně před jejich extravazací a usídlením v kostní dřeni. Naopak narušení těchto vazeb (down-regulace a

degradace adhezivních vazeb, desensitizace CXCR4/SDF-1 α - viz dále) různými mechanismy 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 granulopoezy (G-CSF, filgrastim), a to z důvodu jeho dobré efektivity, předvídatelnosti a bezpečnosti. Hemopoetické kmenové buňky mobilizované G-CSF se přihojují dříve než buňky získané z kostní dřeně nebo pupečnickové krve, což vede k rychlejší rekonstrukci periferního krevního obrazu, lymfocytárních subpopulací, a k nižší mortalitě spojené s transplantací.

1.2.4. Centrální role CXCR4/SDF-1 α interakce

Chemokin SDF-1 α (CXCL12) je produkován osteoblasty v endostálním okrsku kostní dřeně a stromálními buňkami. Má význam nejen pro chemotaxi kmenových i zralých krevních buněk, ale uplatňuje se i v B- lymfopoeze a myelopoeze. Jeho receptor CXCR4 (= CD184) je exprimován řadou tkání, vedle hemopoetických kmenových buněk a endotelií (kostní dřeně) také epiteliálními, mozkovými a dalšími buňkami (11, 12). SDF-1 α představuje gradient, ke kterému HSC migrují, a kterým jsou zachyceny v mikroprostředí kostní dřeně (12). Genetické experimenty potvrzují, že pro udržení HSC v kostní dřeni se jeví jako nejdůležitější chemotaktická osa CXCR4/SDF-1 α . Transplantace myších CXCR4^{neg/neg} HSC do letálně ozářené myši vede sice k homingu HSC do kostní dřeně, ale po několika týdnech dochází k dramatickému zvýšení počtu cirkulujících HSC, což dokládá nepostradatelnost CXCR4 pro udržení HSC v kostní dřeni (13). Jiný zvířecí experiment využil vložení sekvence kódující fluorescenční protein (GFP) do SDF-1 α alely. To umožnilo vizualizaci buněk exprimujících SDF-1 α v kostní dřeni fluorescenční mikroskopií (6). Autoři prokázali, že HSC jsou v přímém kontaktu s dřevými stromálními buňkami silně exprimujícími SDF-1 α (tzv. CAR buňky = CXCL12 abundandní retikulární buňky), viz obrázek 1. Podání protilátky proti CXCR4 brání u myši přihojení lidských SCID kmenových buněk, naopak up-regulace CXCR4 vede ke zvýšené migraci a homingu zprostředkovaným SDF-1 α (14).

Interakce mezi CXCR4 a jeho ligandem SDF-1 α hraje tedy klíčovou roli v regulaci usídlení, migrace a mobilizace HSC v průběhu „steady state“ hemopoezy a při mobilizačním podnětu/poranění (12).

Exprese CXCR4 na hemopoetických kmenových buňkách je dynamická a regulovaná cytokiny a chemokiny. Expozice mobilizovaných CD34+ buněk stem cell faktoru (SCF), IL-6, hepatocyte growth faktoru (HGF) nebo jejich kombinaci znamená up-regulaci CXCR4 a zvýšenou migrační aktivitu CD34+ buněk. Vlivem cytokinů může být intracelulární CXCR4 exprimován na povrchu původně CXCR4^{neg} HSC (14).

1.2.5. Ostatní adhezivní interakce

Pro homing a udržení HSC v kostní dřeni jsou vedle CXCR4/SDF-1 α cesty důležité ještě další adhezivní interakce. Stromální buňky exprimují VCAM-1, který se váže na svůj integrinový receptor VLA-4 na povrchu HSC. Na myších modelech vede zablokování VCAM-1 nebo jeho receptoru ke zvýšenému uvolnění HSC do periferní krve (15).

Vazba HSC ke stromálním buňkám je závislá také na přítomnosti heparan sulfátových proteoglykanů v extracelulární matrix, které jsou produkovány stromálními buňkami. Tato vazba je uvolňována heparanasou a při pokusech na transgenních myších zvýšeně exprimujících heparanasu byl pozorován zvýšený počet a migrační potenciál HSC v periferní krvi (16). Hladiny SDF-1 α v kostní dřeni byly u těchto myší signifikantně sniženy, což naznačuje určitou vzájemnou interakci mezi SDF-1 α a heparanasou v procesu buněčné migrace zprostředkované heparanasou.

Pohyb HSC je ovlivněn také interakcí antigenu CD44 a jeho ligandu – hyaluronové kyseliny (HA). Homing CD34+ buněk může být blokován anti-CD44 monoklonální protilátkou, solubilní hyaluronovou kyselinou nebo působením hyaluronidasy. CD44/HA interakce může hrát roli v SDF-1 α dependentní transendoteliální migraci (17).

Svoji důležitou roli při homingu a mobilizaci hraje pravděpodobně také antigen CD26 (DPPIV/dipeptidyl-peptidáza IV). CD26/DPPIV je extracelulární membránově vázaná peptidáza exprimovaná na CD34+ buňkách. CD26/DPPIV štěpí N-konec polypeptidového řetězce se specifickou sekvencí a při mobilizaci štěpí chemokin SDF-1 α na neaktivní formu (18). Inhibice nebo ztráta CD26 aktivity vede k redukci mobilizace stimulované G-CSF a naopak zvýšení migrační aktivity k SDF-1 α gradientu. U CD26^{neg/neg} myší bylo množství vyplavených CD34+ buněk zřetelně nižší než u wild-type myší v důsledku

absence CD26/DPPIV aktivity (19). CD26 je tedy důležitou komponentou této cytokinové mobilizační cesty (20). Bohužel mechanismus, jakým je aktivita CD26/DPPIV ovlivňována resp. spouštěna působením G-CSF, není zcela jasný.

Uplatňuje se však i řada jiných antigenů a jejich vazebných partnerů jako tyrosin kinázový receptor c-kit/kit ligand, CD62L/CD62, P- a E- selektiny, další integriny jako LFA-1/ICAM-1 atd.

Nedostatečná mobilizace může být dána poškozením mikroprostředí kostní dřeně nebo nedostatečným počtem HSC. Postupy, které podporují formování kosti, mohou zvýšit počet HSC v kostní dřeni a zlepšit výsledek mobilizace. Tento efekt má například parathormon. Parathormon chrání a udržuje osteoblastické okrsky a pool HSC před škodlivým vlivem opakovaných chemoterapií. Studie na pacientech špatně mobilizovatelných G-CSF dokázala zařazením parathormonu při druhém mobilizačním pokusu úspěšně stimulovat 47 % pacientů a při třetím mobilizačním pokusu 40 % pacientů (21).

1.2.6. Nepřímá mobilizace pomocí G-CSF

Mobilizace indukovaná G-CSF je vícestupňový proces, který spočívá jednak v narušení mezibuněčných kontaktů štěpením adhezivních vazeb a jednak v zásahu do CXCR4/SDF-1 α osy. 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, kde se proteázy kumulují a zvyšuje se jejich koncentrace. Tyto proteázy štěpí a inaktivují některé adhezivní vazby jako CXCR4/SDF-1 α , VCAM-1/VLA-4 a umožňují tak mobilizaci HSC (22). Typickým preparátem je již zmíněný růstový faktor granulopoezy (filgrastim, G-CSF), který je již druhé desetiletí standardním mobilizačním cytokinem. Obdobně ale mohou působit i jiné neutrolily aktivující cytokiny jako IL-8, GRO- β (váže se na CXCL2 receptor), které byly taktéž v minulosti jako mobilizační látky testovány. G-CSF indukuje především akumulaci elastazy a cathepsinu G v kostní dřeni, mobilizace pomocí interleukinu - 8 je spíše závislá na aktivitě matrix metalloproteinazy 9 (MMP-9). Detaily ukazuje obrázek 3.

Příčinou down-regulace SDF-1 α je při aplikaci G-CSF vedle proteolytického působení také snížení transkripce SDF-1 α ve stromálních buňkách (23). G-CSF tak reguluje expresi SDF-1 α na úrovni mRNA. Pokusy potvrdily, že myš deficientní na

neutrofilní proteázy je stále schopna reagovat mobilizací HSC na aplikaci G-CSF (24). Mechanismus je pravděpodobně nepřímý, zprostředkovaný myeloidními buňkami kostní dřeně. Samotné SDF-1 α exprimující buňky nenesou receptor pro G-CSF.

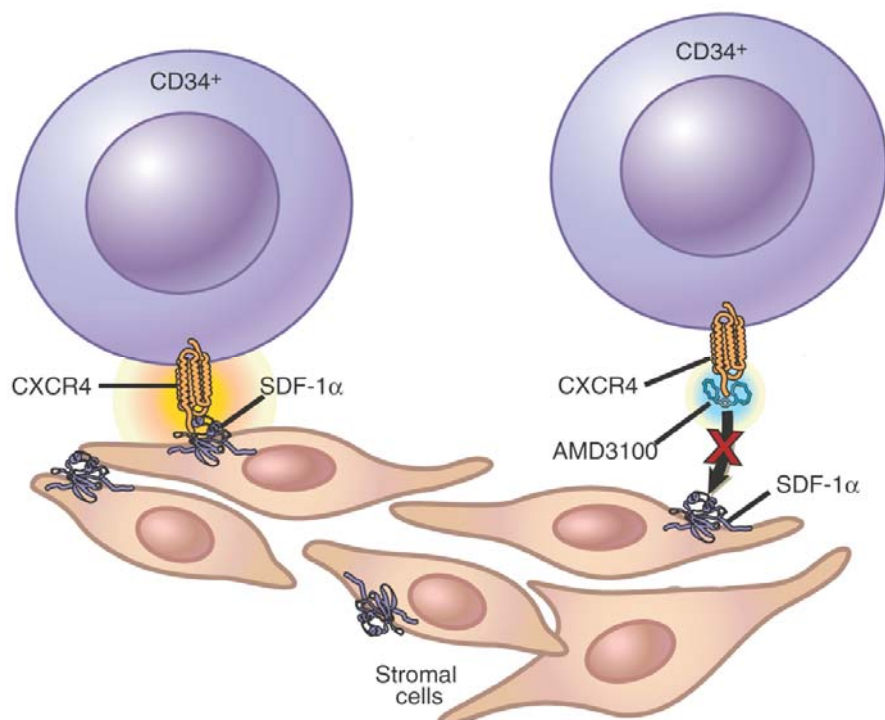
Při stimulaci G-CSF/chemoterapií dochází dále k down-regulaci exprese serine-proteinázových inhibitorů (např. α 1-antitrypsin = serpina1), které normálně mohou blokovat proteolytickou aktivitu neutrofilní elastázy eventuálně cathepsinu G uvolněných v kostní dřeni. To umožňuje akumulaci proteáz v mikroprostředí kostní dřeně (25).

Farmakokineticky je po subkutánní aplikaci filgrastimu dosaženo maximální sérové koncentrace během 2 – 8 hodin. Nejvyšší hladiny cirkulujících CD34+ buněk je dosaženo za 6 - 12 hodin po injekci při dávce 5 μ g/kg (26). Clearance G-CSF se zvyšuje s rostoucí leukocytozou v průběhu stimulace a pro udržení účinné mobilizační hladiny je potřeba dalších dávek. Při leukocytoze nad 20 x 10⁹/l klesá sérová hladina G-CSF po podání dávky 10 μ g/kg během 12 hodin pod hladinu 10 ng/ml, která poskytuje maximální klonogenní stimulaci prekurzorů in vitro (27). S ohledem na farmakokinetiku a relativně krátký eliminační poločas filgrastimu (3 - 4 hodiny) je rozdělení denní dávky do dvou aplikací efektivnější ve srovnání s aplikací stejného množství v jedné denní dávce (28).

1.2.7. Přímá mobilizace (CXCR4)

Pochopení mechanismů, které se uplatňují při migraci HSC z kostní dřeně do periferní krve v průběhu mobilizace, bylo předpokladem vývoje nových mobilizačních látek přímo zasahujících HSC. Většina dosud používaných mobilizačních molekul ovlivňuje podpůrné buňky (granulocyty, stromální buňky, osteoblasty), nikoliv samotné HSC (viz obrázek 3). Ideálním cílem pro přímé působení na HSC je chemokinový receptor CXCR4, který je součástí základní chemotaktické interakce udržující HSC v kostní dřeni, jak ukazuje obrázek:

Mechanismus účinku plerixaforu



V současné době je k dispozici několik antagonistů CXCR4. Jeden z nich – AMD3100 (plerixafor) – prošel již klinickými studiemi fáze II a III provedenými na pacientech s NHL a MM i na zdravých dárcích (29, 30). Po podkožní aplikaci navozuje rychlou mobilizaci CD34+ buněk s maximem za 4 - 9 hodin. Preparát není růstovým faktorem. Jde o malou bicyklamovou molekulu, která byla původně vyvinuta jako protivirový preparát zabraňující vstupu HIV do CD4+ T- lymfocytů blokadí CXCR4 receptoru (31). Plerixafor se váže specificky na CXCR4 receptor a inhibuje SDF-1 α indukovanou internalizaci CXCR4. V rámci testování molekuly byla po aplikaci léku zjišťována leukocytoza (32), která směřovala další výzkum k problematice mobilizace hemopoetických kmenových buněk z kostní dřeně.

Efekt plerixaforu je synergistický s mobilizačním potenciálem G-CSF, proto se k mobilizaci pacientů i zdravých dárců využívá kombinace obou preparátů. CXCR4 může být exprimován i na povrchu nádorových buněk, což s sebou nese riziko kontaminace autologního transplantátu nádorovými elementy. Na druhou stranu může být tento efekt využit k modifikaci chemoterapeutických režimů v hemato-onkologii. Protože receptor CXCR4 může být přítomen i na leukemických buňkách, zkouší se plerixafor i jako součást chemoterapeutických léčebných režimů pro akutní leukémie. Jeho použití může teoreticky zvýšit senzitivitu k chemoterapii mobilizací leukemických blastů do periferní krve nebo narušením interakce blastů s mikroprostředím kostní dřeně, která se podílí na

chemorezistenci a odolnosti k chemoterapii indukované apoptoze (33). Plerixafor může takto získat své místo v rámci záchranných protokolů pro léčbu refrakterních a relabujících akutních myeloidních leukémií.

1.3. Ostatní mobilizační preparáty

Vedle již zmíněných molekul existuje celá řada dalších preparátů, které jsou schopné indukovat mobilizaci HSC do periferní krve (viz tabulka níže). Využívají různých mechanismů účinku, z tohoto důvodu se také jejich efektivita a kinetika odlišuje (34). Jejich kombinace může mít aditivní nebo synergistický efekt a jejich použití může produkovat transplantáty, mezi kterými jsou kvantitativní ale i kvalitativní rozdíly. Mobilizace růstovými faktory a cytokiny nebo anti- integrinovými protilátkami vyžaduje pro dosažení maximálního efektu zpravidla několikadenní aplikaci. Naopak mobilizace chemokiny nebo antagonisty je rychlá a dosahuje maxima v minutách, maximálně v hodinách.

Přehled mobilizačních preparátů (18, 35, 40)

skupina	příklady	čas do maximální mobilizace
chemoterapie	cyklofosfamid, vepesid	1 – 3 týdny
růstové faktory	G-CSF, GM-CSF, stem cell factor, IL-8, parathormon	4 – 6 dní
protilátky	anti-VLA-4, anti-VCAM-1	1 – 2 dny
chemokiny	GRO β , CTCE0021, CTCE0214, MIP1 α	15 min - 2 hod
antagonisté receptorů, inhibitory signálních cest	plerixafor, Rho GTPase inhibitor	1 – 6 hod

Vedle již zmiňovaného plerixaforu zasahujícího do centrální chemokinové interakce CXCR4/ SDF-1 α se slibnými jeví některé další látky jako např. chemokiny GRO β , či MIP1 α , peptidové analogy CTCE0021/CTCE0214 a další. GRO β („growth regulated oncogene- β “, CXCL2) je ligandem chemokinového receptoru CXCR2 a působí synergisticky s G-CSF. CTCE0021 a CTCE0214 jsou peptidové analogy SDF-1 α . Žádný z uvedených preparátů není t.č. zatím testován v klinických studiích.

Ukazuje se, že transplantáty mobilizované G-CSF a některými novými molekulami mají odlišné vlastnosti či kompozici. Transplantáty získané pomocí kombinace G-

CSF a plerixaforu vykazují vyšší hladinu exprese integrinu VLA-4, lépe migrují podle SDF-1 α gradientu a rychleji se připojují (11). Mobilizace pomocí GRO β produkuje HSC se zvýšenou schopností homingu a engraftmentu, lepšími adhezivními vlastnostmi a snad i lepším přežitím (35). Použití klasické „cytokinové“ cesty a cesty „chemokinové“ může tedy vést k získání transplantátů s různými vlastnostmi.

1.4. 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 (36). Protokol využívající tříbarevné flowcytometrie umožňuje stanovit jak procentuální zastoupení tak absolutní počty CD34+ buněk. Pro určení absolutních hodnot slouží buď vhodný kalibrátor vložený do analyzovaného vzorku (single platform metoda) nebo se pro výpočet využije koncentrace leukocytů stanovená hematologickým analyzátozem (double platform metoda). Začlenění vhodného vitálního barviva (7-amino actinomycin D, 7-AAD) umožňuje detekovat současně ve třetím optickém kanále životnost buněk, která je dalším důležitým hlediskem při posuzování kvality transplantátu. Přes výraznou redukci mezilaboratorní event. intralaboratorní variability nelze hodnoty změřené různými laboratořemi považovat za zcela ekvivalentní a tuto skutečnost je třeba si uvědomovat při vzájemném porovnávání dat. Zároveň je nezbytné, aby byly všechny laboratoře zapojené do vhodných kontrolních systémů a kontinuálně ověřovaly přesnost a reprodukovatelnost svých měření (37).

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. Produkt se kumuluje ve vitálních progenitorech podle míry aktivity ALDH a umožňuje stanovit nejen procentuální zastoupení ale současně i životnost HSC.

1.5. Mobilizace HPC pro autologní transplantaci (pacienti)

1.5.1. Mobilizační schémata

Cytostatika byla nepochybně prvními léky, které byly využívány k mobilizaci HSC v množství dostatečném pro zajištění vysocedávkované chemoterapie. Chemoterapie vede nejprve k útlumu kostní dřeně následovanému rekonstitucí hematopoiezy ze zbylých kmenových buněk. V rámci této regenerace dochází k mobilizaci HSC do periferní krve.

S nástupem růstových faktorů granulopoiezy se mobilizace začala provádět aplikací cytokinů nebo kombinace cytokinů a chemoterapie. Nejčastěji používaným cytokinem k mobilizaci autologních CD34+ buněk je G-CSF, podávaný zpravidla v dávce 10 µg/kg/den v jedné nebo dvou denních dávkách po dobu 4 - 6 dnů. Leukaferazy se provádí ode dne +4 nebo +5 do doby nastřádání potřebné dávky krvetvorných kmenových buněk.

Mobilizace kombinací chemoterapie a G-CSF zpravidla umožňuje dosáhnout vyšších hladin cirkulujících progenitorů a získat cílovou dávku HSC při menším počtu leukaferéz. Příklad nejčastěji používaných mobilizačních chemoterapií viz tabulka:

dg.	chemoterapie	složení	citace
MM	CY 1.5 – 2.0	cyklofosfamid	116
NHL	CY až 4.0	cyklofosfamid	116
	DHAP	dexametazon, cytarabin, cisplatina	129
	DexaBEAM	dexametazon, carmustin, etoposid, cytarabin, melphalan	128
	ESHAP	etoposid, methylprednisolon, cytarabin, cisplatina	126
	HAM	cytarabin, mitoxantron	127
	ICE	ifosfamid, carboplatina, etoposid	125

pozn.: všechny protokoly v kombinaci s G-CSF

Po stimulaci samotným G-CSF nebo kombinací chemoterapie plus G-CSF může dávku 2×10^6 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 (38). Rychlost příhojení i parametry přežití po autologní transplantaci jsou stejné u transplantátů získaných jak pomocí G-CSF tak kombinací chemoterapie plus G-CSF (39). 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 (remobilizací), 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. Pacienti, u kterých lze očekávat na základě prediktivních faktorů standardní průběh mobilizace, mohou být úspěšně mobilizováni pouhým G-CSF a nemusí být vystaveni chemoterapii nebo podaná chemoterapie může být méně intenzivní. Naopak nelze od kombinačních stimulačních režimů očekávat spolehlivé odstranění eventuální nádorové kontaminace transplantátu. Proto je vhodnější, tam kde je to možné, indikovat mobilizaci v době kompletní remise onemocnění nebo využít například monoklonálních protilátek k peritransplantačnímu in vivo čištění transplantátu nebo potransplantační udržovací terapii.

1.6. Mobilizace HPC pro alogenní transplantaci (zdraví dárce)

1.6.1. Mobilizační schémata

Pro mobilizaci zdravých dárců je standardním a obecně akceptovaným cytokinem G-CSF (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.

1.6.2. 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 nikoliv však akutní 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, 40 - 42). Produkty získané po stimulaci perixaforem plus G-CSF vykazují zvýšenou expresi genů asociovaných s DNA reparací, anti- apoptotickými mechanismy a buněčnou motilitou (18, 43).

1.7. Faktory ovlivňující a předikující 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. Důvodem mohou být různé faktory: snížená myeloidní expanze a aktivace, snížená produkce proteáz, omezený pool kmenových buněk v kostní dřeni, suboptimální mikroprostředí kostní dřene atd.

Je 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 dřene, věk, parametry krevního obrazu apod. (7). Žádný z těchto parametrů však neumožňuje spolehlivou předpověď výsledku mobilizace, nicméně jejich kombinace může u konkrétního pacienta napovídat riziko obtížné mobilizace.

Využitím průtokové cytometrie zkoušeli někteří autoři detekovat rozdíly v expresi některých adhezivních molekul (VLA-4, 1-selectin, LFA-1, CD44, PECAM-1 atd.) na povrchu CD34+ buněk mezi dobře a špatně mobilizujícími jedinci. Intenzita exprese VLA-4 (CD49d) a LFA-1 (CD11a) korelovala u zdravých dárců s efektivitou mobilizace dosahující vyšších hodnot u špatně mobilizovatelných dárců (44).

1.8. 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/ μ 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 (43), u pacientů může tato skupina tvořit 20 - 40 % mobilizací v závislosti na typu onemocnění, předchozí léčbě atd. (45, 46).

1.9. Remobilizace

Při získání nedostatečného transplantátu se lze pokusit o opakování mobilizace s využitím jiného mobilizačního protokolu (remobilizaci) nebo lze spojovat produkty získané z opakovaných mobilizačních pokusů. Existují různé strategie pro opakovanou mobilizaci, které zahrnují zvýšení dávky G-CSF, kombinaci s jiným cytokinem (GM-CSF), kombinaci s chemoterapií, použití intenzivnější chemoterapie, odběr kostní dřene atd. Použití standardních schémat při opakovaných mobilizačních pokusech

bohužel selhává až u 70 – 80 % pacientů (38, 45). Právě pro špatně mobilizovatelné pacienty a dárce je vhodné využít některou z nových mobilizačních molekul.

1.10. 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. V případě pacientů jsou komplikace neřídka obtížně odlišitelné od projevů základního onemocnění a jeho kauzální léčby a jejich analýza je problematická a také klinicky méně přínosná.

1.10.1. 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 závislé na dávce a které jsou omezeny na krátké období stimulace a odeznívají obratem (max. do 2 – 4 dní) po vysazení filgrastimu (31). Laboratorně dochází vedle očekávané leukocytozy k přechodnému poklesu trombocytů a k jejich návratu do předodběrových hodnot v průběhu několika týdnů až měsíců (47).

Závažnější nebo dokonce život ohrožující události jsou extrémně vzácné (v roce 2007 bylo hlášeno 9 takovýchto závažných komplikací na 8756 odběrů periferních kmenových buněk nebo kostní dřeně od nepříbuzných dárců, což odpovídalo méně než 0.103 % odběrů, údaje WMDA). Filgrastim navozuje aktivaci koagulace i endotelu a může zvyšovat riziko vzniku trombotických příhod u predisponovaných jedinců (48). Popsané případy cerebro- nebo kardiovaskulárních příhod, vzniklých v souvislosti se stimulací, jsou však ojedinělé. Stejně výjimečnou komplikací je spontánní ruptura sleziny (49).

1.10.2. 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. Existují menší studie s mediánem sledování maximálně 3 roky, které neprokázaly zvýšené riziko vzniku leukémie či jiného nádorového onemocnění po stimulaci G-CSF (50, 51). Ojedinelé případy dárců, u kterých došlo k rozvoji malignity, nevybočovaly z očekávané incidence nádorových onemocnění v dospělé populaci příslušného věku. Zčásti se navíc jednalo o příbuzné dárce pacientů s leukémií, kde je riziko vzniku leukémie 2-3 x vyšší ve srovnání s ostatní populací (52, 53). Vliv G-CSF na vznik leukémie zůstává tedy spekulativní a dostupná data se musí interpretovat uvážlivě.

1.11. 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 % (10, 31). Nejčastěji se vyskytují problémy způsobené antikoagulací (citrátová toxicita) a komplikace ze strany žilního přístupu (dokonce až okluze centrálního žilního katétru). Hematologické komplikace zahrnují přechodnou anémii a trombocytopenii vyžadující někdy substituční terapii. Méně často se vyskytuje hypotenze, nauzea, nebo některé další komplikace související již spíše s eventuelním přidruženým onemocněním. Komplikace jsou většinou mírné a pouze 0.89 % reakcí je klasifikováno jako závažné nežádoucí reakce (31). Nezřídka se objevují - jako následek přípravného režimu - také infekční komplikace či febrilní neutropenie v terénu doznívající granulocytopenie, předchozí imunoprese, poškození přirozených bariér, a to až u 16 % pacientů (10).

V případě zdravých dárců jsou závažné nežádoucí reakce taktéž 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 (hematom, krvácení), bolesti na hrudi atd. (47).

2. 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 předmobilizačních 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 zrcadlí změny adhezivních interakcí mezi hemopoetickými kmenovými buňkami a mikroprostředím kostní dřeně, jako prediktivních faktorů.

3. Metody a soubory pacientů

3.1. Pacienti

Analyzovány byly dva soubory pacientů s frekventními nádorovými onemocněními krvetvorby – chronickou lymfatickou leukémií (CLL) a mnohočetným myelomem (MM). Pro pacienty s CLL je typická spíše obtížnější mobilizace, naopak u mnohočetného myelomu nebývá získání autologního transplantátu zpravidla komplikované. Problematika mobilizace pacientů s chronickou lymfatickou leukémií po léčbě purinovými analogy byla v době zahájení studie nejasná a nutila nás k analýze vlastních zkušeností a k jejich porovnání se situací u jiné hematologické malignity typicky indikované k vysocedávkované chemoterapii.

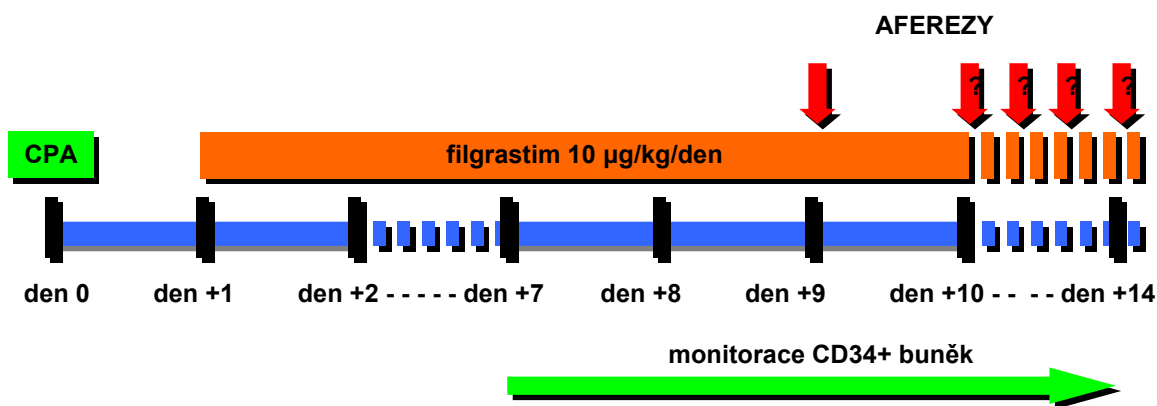
3.1.1. CLL pacienti

Studováno bylo 56 pacientů s prognosticky nepříznivou chronickou lymfatickou leukémií. Všichni pacienti byli léčeni kombinovanou chemoterapií fludarabin (30 mg/m² 1. – 3. den) a cyklofosfamid (250 mg/m² 1. - 3. den) 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 National Cancer Institute Working Group kritérií byli pacienti mobilizováni z důvodu plánované konsolidace vysocedávkovanou chemoterapií. Pacienti byli indikováni k mobilizaci pouze pokud měli ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skóre 0- 2, normální jaterní, renální a kardiální funkce a věk do 70 let. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do léčebného protokolu schválený lokální etickou komisí. Detaily jsou uvedeny v tabulce 1. a grafu 1.

Mobilizační režim byl tvořen kombinací cyklofosfamidu v dávce 3 g/m² a filgrastimu 10 µg/kg/den (ode dne +1) u 53 pacientů, 3 pacienti byli mobilizováni intenzifikovaným režimem Dexa-BEAM (dexametazon 25 mg 10 dní, BCNU 60 mg/m², etoposid 75 mg/m² a cytosin arabinosid 200 mg/m² po 4 dny a melphalan 20 mg/m²) plus G-CSF 10 µg/kg/den (ode dne +10). Filgrastim byl aplikován podkožně v jedné denní dávce. Mobilizace byla zahájena minimálně 2 měsíce od poslední chemoterapie, medián intervalu mezi posledním chemoterapeutickým cyklem a mobilizací byl 77 dní (rozmezí 35 – 242). Krevní obraz byl denně analyzován od dne +7, při vzestupu leukocytů nad 0.5 x 10⁹/l byly stanovovány

také CD34+ buňky v periferní krvi. Načasování aferez bylo řízeno vzestupem hladiny CD34+ buněk nad 10.0/μl. Cílová dávka CD34+ pro provedení autologní transplantace byla stanovena na $\geq 2.0 \times 10^6$ /kg hmotnosti pacienta.

Mobilizační schéma – pacienti s chronickou lymfatickou leukémií nebo mnohočetným myelomem



pozn.: pro CLL dávka cyklofosfamidu 3 g/m², pro mnohočetný myelom 3 g/m² nebo 5 g/m²
CPA = cyklofosfamid

Leukaferozy byly provedeny na kontinuálních separátorech krevních elementů (COBE Spectra, Caridian BCT). Při každé afereze byly zpracovány 3 – 4 objemy krve (průměr 17 litrů). Aferézní produkty byly kontrolovaně kryokonzervovány v 10 % roztoku dimethylsulfoxidu a uchovány v tekutém dusíku. Sledování nežádoucích účinků filgrastimu a aferéz nebylo cílem analýzy.

3.1.2. MM pacienti

Mobilizováno bylo 73 pacientů s mnohočetným myelomem po standardní léčbě protokolem VAD (vincristin, adriamycin, dexametazon), pouze 5 pacientů bylo krátce předléčeno alkylačními cytostatiky (melphalan, < 6 měsíců u všech nemocných). Pacienti byli léčeni v letech 1999 – 2003. Jako mobilizační protokol byl použit cyklofosfamid (3 g/m² 64 pacientů, 5 g/m² 9 pacientů) a filgrastim v dávce 10 μg/kg/den. Základní charakteristiky a parametry odpovědi na úvodní léčbu jsou uvedeny v tabulce 2.

Hodnoty krevního obrazu a hladina CD34+ buněk v periferní krvi byly monitorovány ode dne +7. Aferezy byly zahajovány při vzestupu CD34+ buněk minimálně nad 10.0/μl. Cílem bylo získat minimální dávku CD34+ buněk $\geq 4.0 \times 10^6$ /kg hmotnosti pacienta k zajištění dvou vysocedávkovaných chemoterapií s autologní transplantací.

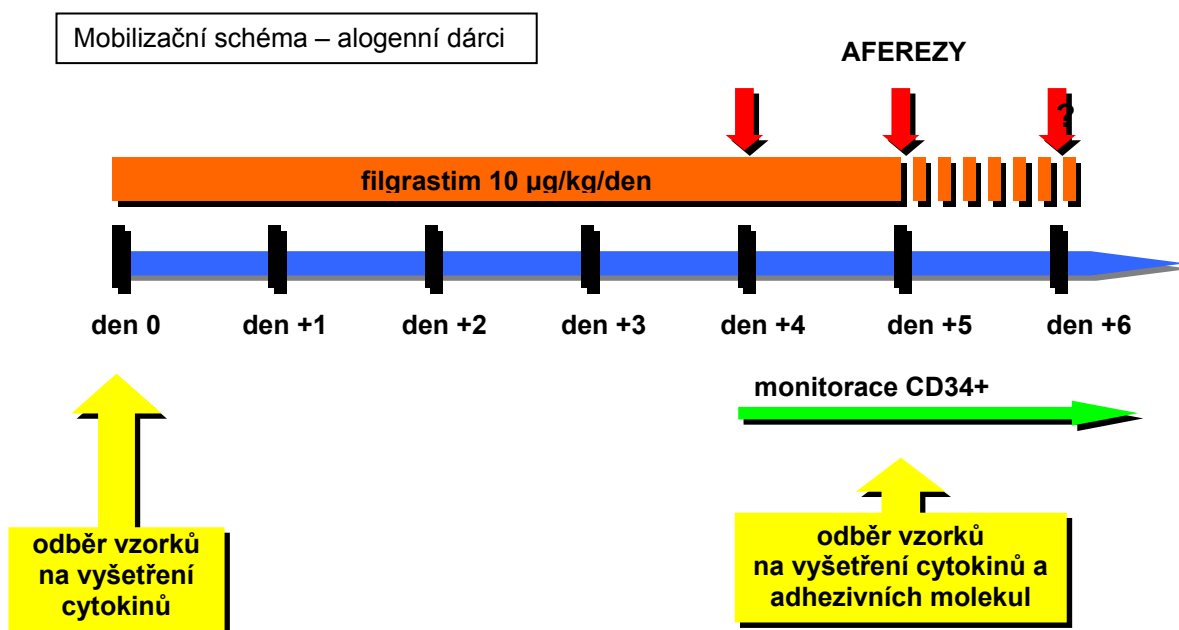
Leukaferozy byly provedeny na kontinuálních separátorech krevních elementů (COBE Spectra, Caridian BCT). Při každé aferoze byly zpracovány 3 – 4 objemy krve (průměr 17 litrů). Aferézní produkty byly kontrolovaně kryokonzervovány v 10 % roztoku dimethylsulfoxidu a uchovány v tekutém dusíku. Sledování nežádoucích účinků filgrastimu a aferéz nebylo cílem analýzy.

3.2. 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 (58 mužů, 45 žen) byla porovnávána se skupinou 121 mladších dárců < 50 let (86 mužů, 35 žen). Starší dárce byli příbuzní, naopak mladší dárce byli většinou (69 %) nepříbuzní dobrovolníci z Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD). Medián věku dárců byl 59 (rozmezí 55 – 75) versus 29 (17 – 48) let. Bližší charakteristiky dárců sumarizuje tabulka 3.

Dárce byli stimulováni filgrastimem v dávce 11 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$ (medián, rozmezí 9 - 16) aplikovaným podkožně v jedné nebo dvou denních dávkách. Preparát byl podáván po dobu 4 až 5-ti dnů, pouze u 5-ti dárců byla aplikace prodloužena do šestého dne. Cílová dávka CD34+ buněk byla $\geq 4 \times 10^6/\text{kg}$ hmotnosti příjemce, minimální akceptovatelná dávka $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$.



Přidružená onemocnění dárců byla skórována podle Charlson Comorbidity Indexu (54). Frekvence komorbidit byla vyšší mezi staršími dárci (54 %) ve srovnání s mladšími (6 %), $p < 0.0001$. Blíže ukazuje graf 2. (Fischerův exaktní test).

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. Aferezy byly zahájeny v den +5 a extendovány maximálně do dne +6. Efektivita stimulace byla u tohoto souboru posuzována podle hladiny CD34+ buněk vyplavených do periferní krve, kvalita aferézního produktu nebyla sledována.

Všichni dárce podepsali informovaný souhlas před zahájením aplikace růstového faktoru granulopoezy. Klinicky relevantní nežádoucí účinky filgrastimu a vlastního odběru byly zaznamenávány u všech dárců do klinických informačních systému podle zvyklostí jednotlivých pracovišť a hodnoceny podle Common Toxicity Criteria skóre (NCI CTC verze 3.0).

Leukaferozy byly provedeny na kontinuálních separátorech krevních elementů (COBE Spectra, Caridian BCT). Jako antikoagulant byl použit roztok ACD-A v poměru 1: 11 – 14 k plné krvi. Detaily jsou uvedeny v tabulce 4.

3.2.1. Stanovení CD34+ buněk a adhezivních molekul

Krevní obraz a hladina CD34+ buněk byly u dárců stanovovány ráno před každou aferezou. 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 dárce hospitalizováni k odběru PBSC. Pro všechny analýzy bylo použito přímé značení a „lyse no wash“ metoda (lyzace NH_4Cl).

Tabulka protilátek použitých pro imunofenotypizaci

antigen	klon	fluorochrom	výrobce
CD34	581	PE	Beckman Coulter, Fullerton,
CD45	J33	FITC	Beckman Coulter, Fullerton,

CD11a	MEM-25	FITC	Invitrogen, Carlsbad, USA
CXCR4	12G5	PE	Invitrogen, Carlsbad, USA
CD44	IM7	FITC	eBioscience, San Diego, USA
CD117	95C3	PE	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CD26	2A6	FITC	eBioscience, San Diego, USA
CD49d	9F10	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD34	581	PC5	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CD45	J33	ECD	Beckman Coulter, Fullerton, USA
7-AAD	NA	NA	Beckman Coulter, Fullerton, USA
ALDH	NA	NA	Stem Cell, Vancouver, Canada

FITC – fluorescein isothiocyanate, PE – phycoerythrin, PC5 - phycoerythrin-cyanin 5, ECD – phycoerythrin + texas red

3.2.2. 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 α , sICAM-1, sVCAM-1, MMP-9, IL-6, IL-8, fractalkine, TNF α , 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), bezprostředně zamrazeny na -80 °C a následně testovány do 6-ti měsíců od odběru. Před analýzou byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a centrifugovány po dobu 2 min při 10000 g. Ve vzorcích séra byla stanovena hladina IL-6, IL-8, fractalkine, TNF α , VEGF a ve vzorcích plazmy hladiny sICAM-1, sVCAM-1, MMP-9, E-selektin pomocí multiplexové imunoanalýzy využívající xMAP (LUMINEX) technologii. K analýze byly využity soupravy Human Cardiovascular Disease Panel 1 a Human Cytokine Lincoplex kit (Millipore Corporation, Billerica, USA). Pro každou analýzu bylo použito 25 μ l vzorku, před analýzou HCVD1 panelu byly vzorky naředěny 1:100. Měření proběhlo na přístroji Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, USA). Ve vzorcích plazmy byla dále stanovena hladina SDF-1 α metodou ELISA soupravou Quantikine Human CXCL12/SDF-1 α (R&D Systems, Minneapolis, USA). Všechna stanovení byla provedena v dubletu.

Vypočtené variační koeficienty (CV %) pro jednotlivé analyty z multiplexové analýzy vzorků v dubletu:

	sICAM-1	sVCAM-1	MMP-9	IL-6	IL-8	fractalkine	TNF α	VEGF
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
průměr	6,25	7,13	7,60	11,38	12,28	6,57	10,82	9,58
medián	4,55	5,33	6,04	3,85	11,12	0,00	5,22	4,80

Principem multiplexové imunoanalýzy je vazba analytu na protilátku navázanou na povrchu barevně kódovaných mikrokuliček. Množství navázané látky je stanoveno díky druhé protilátce spojené s fluorescenční molekulou. Měření probíhá na speciálním průtokovém cytometru, který určuje jedním laserem spektrální kód kuličky (druh analytu) a druhým laserem množství navázané druhé protilátky (kvantitu analytu). Grafický výstup analýzy ukazuje obrázek 6. Koncentrace jednotlivých analytů jsou vypočteny na základě standardních kalibračních křivek (55).

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.

3.3. Statistické hodnocení

Ve všech skupinách a podskupinách byly stanoveny základní statistické charakteristiky. K popisu distribuce sledovaných proměnných byly vytvořeny Box&Whisker diagramy. Porovnání proměnných bylo provedeno pomocí neparametrického mediánového testu, dále byl použit nepárový T- test, Mann-Whitney test, chi-kvadrát test a Fischerův exaktní test. Párová data byla analyzována znaménkovým testem. Vztahy mezi proměnnými byly testovány využitím Spearmanových korelačních koeficientů, Pearsonových korelačních koeficientů a vyjádřeny graficky lineární regresí. Kategorické proměnné byly popsány kontingenčními tabulkami a analyzovány pomocí chi-kvadrát testu dobré shody. Změny trendů sledovaných proměnných v čase a jejich porovnání bylo provedeno Friedmanovou a parametrickou ANOVou. Multivariantní analýza byla zpracována pomocí mnohonásobné regrese. Ke statistickému hodnocení byly použity software CRAN 2.4.0 (freeware), Statistica 98 Edition (StatSoft Inc., Tulsa, USA), GraphPad Instant software 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

4. Výsledky

4.1. 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.

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

4.2.1. 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/ μl) 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 (viz tabulka 1.).

Maximální hladina CD34+ buněk dosažená v periferní krvi po dobu monitorace – mezi dny +9 až +12 – byla 25.0/ μl u úspěšně mobilizovaných a 3.4/ μl u nonresponderů (mediány, $p < 0.0001$). Pouze u pacientů stimulovaných protokolem DexaBEAM byl peak CD34+ buněk přítomen později - v den +16. Kinetika leukocytů byla v obou porovnávaných skupinách stejná ($p = 0.6909$, parametrická repeated ANOVA), zatímco kinetika CD34+ měla jiný průběh ($p < 0.0001$, parametrická repeated ANOVA), jak dokládají grafy 3a.+3b. a 4a.+4b.

Podle Spearmanovy analýzy koreloval počet CD34+ buněk pozitivně s některými předaferetickými 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 ($p=0.0156$, $r_s = -0.34$). Trombocyty nad $120 \times 10^9/l$ byly přítomné u 91 % úspěšně vs. u 57 % neúspěšně mobilizovaných pacientů, leukocyty nad $5.0 \times 10^9/l$ u 74 % vs. 36 % a hemoglobin nad 130 g/l u 87 % vs. 64 %. Data ukazují, že pacienti s dlouhotrvající pancytopenií po fludarabinu nejsou schopni mobilizovat dostatečné množství hemopoetických kmenových buněk.

Při testování mnohonásobnou regresí („general linear model“) se jako nezávislé faktory ovlivňující výsledek mobilizace ukázaly hladina hemoglobinu před stimulací ($p=0.0127$, $Beta=0.31$), věk pacienta ($p=0.0132$, $Beta= -0.39$) a především doba od poslední chemoterapie ($p=0.0004$, $Beta=0.43$). Doba mezi poslední dávkou fludarabinu a mobilizací se ukázala být dosti zásadní a pro úspěšnou mobilizaci by neměla být kratší než 2 měsíce (při intervalu < 2 měsíce pouze 8 % úspěšných mobilizací, při intervalu > 2 měsíce 50 % úspěšných mobilizací, $p=0.0098$). Samotný počet cyklů podané standardní chemoterapie neměl na výsledek mobilizace v našem souboru vliv. Regresní funkce měla tvar:

$$\text{Peak CD34+} = -5.46 - 0.055 \times \text{věk} - 0.021 \times \text{doba_od_dg} + 0.067 \times \\ \text{doba_od_CHT} + 0.053 \times \text{PLT_před} + 0.412 \times \text{Hb_před} - 0.140 \times \text{WPB_před}$$

4.2.2. Aferézní produkt

Spearmanova pořadová korelace prokázala silnou závislost mezi hladinou cirkulujících CD34+ buněk v periferní krvi před aferezou a výtěžkem CD34+ buněk/kg hmotnosti pacienta v aferézním produktu ($p<0.0001$, $r_s=0.6509$), jak dokládá graf 5. Celková dávka CD34+ buněk odebraná u úspěšně mobilizovaných pacientů byla $3.3 \times 10^6/kg$ (2.15 – 17.4). K získání dostatečného transplantátu byly potřeba nejčastěji dvě aferezy (medián, rozmezí 1 – 5), které byly provedené ve dnech +9 až +11 od zahájení mobilizace. Pouze u pacientů stimulovaných protokolem DexaBEAM se aferezy odehrávaly později (od dne +16).

Hladina cirkulujících CD34+ buněk v periferní krvi nad $10.0/\mu l$ umožňuje předjímat úspěšnou mobilizaci. Neznamená to ale, že všichni pacienti, kteří dosáhnou této hodnoty, musí získat požadovaný transplantát. Jeden z pacientů v našem souboru nenastřádal přes vyplavení uvedeného množství CD34+ buněk dostatečný štěp z důvodu rychlého poklesu hladiny progenitorů v následujících dnech a nutnosti ukončení série aferez.

Všichni úspěšně mobilizovaní pacienti byli autologně transplantováni. Jako conditioning byl použit cyklofosamid v dávce 200 mg/kg. Engraftment byl u

všech pacientů rychlý – granulocytů $\geq 0.5 \times 10^9/l$ bylo dosaženo v den +10 a trombocytů $\geq 20 \times 10^9/l$ bez potřeby substitucí v den + 11 (mediány).

4.2.3. 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 $\mu\text{g/kg/den}$). 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). Všechny remobilizace byly neúspěšné. Pouze u 4 pacientů byly zahájeny aferezy, které vedly k nedostatečným výtěžkům s mediánem $0.6 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ buněk.

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

4.3.1. Kinetika parametrů krevního obrazu a cirkulujících CD34+ buněk

Soubor 73 pacientů s mnohočetným myelomem byl opět rozdělen do dvou skupin podle efektivity mobilizace resp. schopnosti získat požadovanou 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), z toho u 4 pacientů byl získán pouze jeden transplantát. 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 ($p=0.0363$). Detaily ukazuje tabulka 2.

Využitím Spearmanovy pořadové korelace jsme prokázali vztah mezi hladinou hemoglobinu před mobilizací a množstvím CD34+ buněk v periferní krvi pacienta v den první aferézy ($p=0.0159$, $r_s=0.27$). Hladina hemoglobinu zároveň negativně korelovala s počtem dní do vzestupu CD34+ buněk v periferní krvi a zahájení leukafézy ($p=0.0035$, $r_s=-0.32$). 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 ($p=0.0118$, $\text{Beta}=0.28$).

Pomocí logistické regrese a kontingenčních tabulek jsme našli pro hladinu hemoglobinu cut-off, které napomáhá odlišit hůře mobilizovatelné jedince. Pacienti s hemoglobinem > 108 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 a trombocytů 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/ μ l vs. 28.0/ μ l ($p<0.0001$). Taktéž hladina trombocytů před první aferezou byla ve skupině A vyšší s mediánem $71 \times 10^9/l$ vs. $42 \times 10^9/l$ ($p=0.0489$), s následným poklesem vlivem aferéz a G-CSF.

4.3.2. Aferézní produkt

Mobilizace byla úspěšná u všech pacientů s mnohočetným myelomem. 94 % nemocných získalo dva transplantáty, 6 % nemocných pouze jeden transplantát, nebylo konstatováno selhání mobilizace. Aferezy byly ve skupině A zahájeny dříve (den +8 vs. den +9) než ve skupině B. Dle očekávání byla také celková odebraná množství CD34+ buněk vyšší: $9.7 \times 10^6/kg$ vs. $6.7 \times 10^6/kg$ hmotnosti pacienta (mediány). Bližší údaje v tabulce 5.

4.4. Mobilizace zdravých dárců pomocí G-CSF

4.4.1. 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), jak ukazuje graf 6. CD34+ buňky vykazovaly v periferní krvi statisticky signifikantní vzestup mezi dny +4 a +5 u mladších ($p<0.0001$) i u starších dárců ($p=0.0086$, znaménkový párový test). Viz graf 7. Absolutní hodnota CD34+ buněk v den +5 byla však u mladých dárců téměř dvojnásobná ve srovnání se staršími (72.0 vs. 37.0 buněk/ μ l, $p<0.0001$, neparametrický mediánový test), jak dokládá graf 8.

Analýza celého souboru Spearmanovými pořadovými korelacemi prokázala silnou závislost mezi věkem dárce a hladinou CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 ($p < 0.0001$, $r_s = -0.40$). Pokud byly dárce > 50 let a ≤ 50 let analyzováni samostatně, věk již dle předpokladu nehrál v rámci více homogenních souborů roli. Detaily zobrazeny v grafu 9. Při univariální analýze jsme našli negativní korelaci věku ($p < 0.0001$, $r_s = -0.40$) a pozitivní korelaci leukocytů ($p < 0.0001$, $r_s = 0.32$) a trombocytů ($p < 0.0001$, $r_s = 0.28$) s hladinou CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 (Spearmanova pořadová korelace). Multivariální 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 aferezou. Výsledná funkce měla tvar:

$$\text{CD34}/\mu\text{l} = 51.9 + (\text{vek} * -0.998) + (\text{dávka C-GSF} * -1.131) + (\text{aplikace} * 3.348) + (\text{WBC den+5} * 1.626) + (\text{PLT den+5} * -0.009)$$

Ostatní parametry jako dávka filgrastimu, frekvence aplikace nebyly statisticky významné.

4.4.2. Aferézní produkt

Kvalita odebraných produktů byla sledována využitím řady kritérií. Hlavním parametrem byl obsah CD34+ buněk, dále byly měřeny: obsah leukocytů, obsah CD3+ T-lymfocytů, životnost leukocytů, sterilita produktu, ABO krevní skupina, nepravidelné protilátky v ABO systému, infekční markery (anti-HIV1/2, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV, p24Ag, syfilis).

Medián počtu aferez nutných k získání požadovaného transplantátu byl 2 v celém souboru (1 – 4). Pouze v případě, kdy se nepodařilo nastřádat minimální akceptovatelnou dávku progenitorů, byly aferezy rozšířeny na 3 – 4 procedury. U starších dárců bylo častěji nezbytné provést více než 1 aferezu (viz graf 10.). Získané výtěžky CD34+ buněk byly přepočítány na kilogram hmotnosti dárce, aby bylo možno kompenzovat hmotnostní rozdíly mezi dárce. Obsah CD34+ buněk v transplantátu koreloval s hladinou CD34+ buněk v periferní krvi před aferezou ($p < 0.0001$, Spearmanova pořadová korelace), jak dokládá graf 11.

Během první aferezy 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). Výsledky aferez s ohledem na věk dárce jsou uvedeny v tabulce 6. Lineární regrese potvrdila vliv

věku na výtěžek CD34+ buněk ($p < 0.0001$, $r_s = -0.39$, Spearmanova pořadová korelace). Údaje doplňuje graf 12a. + 12b.

39 % mladších dárců nastrádalo cílovou dávkou CD34+ buněk jednou aferezou, v případě starších dárců postačovala jediná afereza 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). Mediány hodnot celkových dávek CD34+ buněk vyjádřených na kilogram hmotnosti příjemců byly $5.26 \times 10^6/\text{kg}$ (0.45 – 15.12) u starších a $7.66 \times 10^6/\text{kg}$ (1.18 – 32.67) u mladších dárců ($p = 0.0021$, neparametrický mediánový test), jak ukazuje graf 13.

Porovnávali jsme také efektivitu odběru vztaženou k dárci („donor related collection efficiency“) vyjádřenou jako procento CD34+ buněk odebraných z celkového množství CD34+ buněk v periferní krvi dárce před zahájením aferezy. Použili jsme vzorec:

$$\text{donor related CE (\%)} = \frac{\text{obsah CD34+ v produktu}}{\text{CD34+}/\mu\text{l v periferní krvi} \times \text{TBV dárce}}$$

Efektivita odběru byla v obou skupinách stejná 93.6 versus 92.4 % ($p = 0.52$). Celková dávka T- lymfocytů (CD3+ buněk) byla signifikantně vyšší v transplantátech odebraných od starších dárců (průměr 2.56 vs. 1.88×10^{10} , $p = 0.0051$). Vysvětlením jsou pravděpodobně častější aferezy při nižším zastoupení CD34+ buněk a srovnatelné distribuci lymfocytárních subpopulací v periferní krvi. Následně byl výtěžek CD34+ buněk/kg hmotnosti dárce odebraný v den +5 testován univariální analýzou a byla zjišťována závislost proměnných, které byly kandidáty prediktivních faktorů. Výtěžek negativně koreloval s věkem ($p < 0.0001$, $r_s = -0.39$) a pozitivně s hodnotami leukocytů ($p < 0.0001$, $r_s = 0.30$), CD34+ buněk ($p < 0.0001$, $r_s = 0.80$) a trombocytů ($p < 0.0001$, $r_s = 0.33$) v periferní krvi dárce v den +5 (Spearmanova pořadová korelace). Multivariální 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 signifikantně 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. Výsledná funkce měla tvar:

$$\text{CD34+}/\text{kg}/\text{den}+5 = 0.581 + (\text{vek} * - 0.019) + (\text{dávka G-CSF} * - 0.008) + (\text{aplikace} * - 0.034) + (\text{WBC den}+5 * 0.006) + (\text{CD34 den}+5 * 0.042) + (\text{PLT den}+5 * - 0.006)$$

4.4.3. Nežádoucí účinky stimulace a aferezy u zdravých dárců

Mobilizace i afereza byly u všech dárců dobře tolerovány, neobjevily se žádné závažné nežádoucí reakce. Vedlejší účinky aplikace filgrastimu se vyskytovaly 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) a řešitelné pomocí neopiátových analgetik. Pouze u dvou dárců si akutní toxicita filgrastimu vyžádala redukci dávky růstového faktoru. U jednoho staršího dárce byl zaznamenán paroxysmus supraventrikulární tachykardie a u jiného přechodné rozkolísání arteriální hypertenze. Obě komplikace nevyžadovaly přerušování stimulace a byly vyřešeny během krátké doby.

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 jedinců s komorbiditami. Nejčastější reakce jsou sumarizovány v grafu 14. Hladina trombocytů klesala v důsledku aplikace filgrastimu a zejména vlivem aferez u všech dárců. Byly pozorovány trombocytopenie pod $100 \times 10^9/l$, a to u 19 % starších a 2 % mladších dárců (medián $84 \times 10^9/l$, $38 - 93 \times 10^9/l$), ovšem bez jakýchkoliv klinických projevů.

4.4.4. Kinetika 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.

Hladiny některých cytokinů po expozici dárců růstovému faktoru granulopoezy stoupaly (hladiny v den +5 = den první aferezy ve srovnání s hladinami před mobilizací): sICAM-1 ($p<0.0001$), sVCAM-1 ($p<0.0001$), MMP-9 ($p=0.0039$), IL-6 ($p=0.0133$), TNF α ($p<0.0001$) a E-selektin ($p<0.0001$). Hladiny SDF-1 α

($p=0.0002$) a IL-8 ($p=0.0013$) se snižovaly a hladiny fraktalkinu a VEGF zůstávaly beze změny (párový znaménkový test). Grafy 15a. – 15d. zobrazují tyto změny.

4.4.5. Prediktivní význam cytokinů

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. Příklad uvedeny v grafech 16a. – 16b.

Dále byli dárce rozděleni do dvou skupin podle efektivity mobilizace, tedy podle hladiny CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 podávání filgrastimu. Jako hranice pro odlišení dobře a špatně mobilizovatelných dárců byla stanovena hodnota 40.0 CD34+/ μ l. 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 signifikantní 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 tabulka 7. a grafy 17a. – 17b.

Použitím kontingenčních tabulek a logistické regrese byly hodnoty sICAM-1 a IL-6 v den +0 (tedy před mobilizací) 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).

Sensitivita sICAM-1 jako predikátoru výsledku mobilizace byla „pouze“ 69 %, tedy 69 % dárců s hodnotou sICAM-1 ≤ 100 ng/ml bude mít počet CD34+ buněk v den +5 stimulace pod 40.0/ μ l, specificita markeru je „pouze“ 70 %, tedy 70 % dárců s sICAM-1 > 100 ng/ml by mělo vyplavit nad 40.0/ μ l CD34+ buněk. Blíže viz ROC křivka graf 18. Pro IL-6 byla sensitivita 92 %, tedy 92 % dárců s hladinou IL-6 ≥ 32 pg/ml bude mít počet CD34+ buněk v den +5 mobilizace pod 40.0/ μ l, specificita je pouze 57 %, tedy 57 % dárců s hodnotou IL-6 < 32 pg/ml vyplaví nad 40.0/ μ l CD34+ buněk.

4.4.6. Adhezivní molekuly na CD34+ buňkách

Imunofenotypizace adhezivních molekul na povrchu CD34+ buněk v den +5 mobilizace ukázala statisticky nevýznamné rozdíly v procentuálním zastoupení elementů exprimujících tyto antigeny mezi skupinami dobře a špatně mobilizovatelných dárců. Pouze u antigenu CD184 byla patrná hraničně nižší exprese ve skupině dobře mobilizovatelných dárců, jak ukazuje tabulka 8.

Na druhou stranu byl nalezen negativní vztah mezi hladinou CD34+ buněk v periferní krvi a expresí dvou adhezivních molekul (v %): CD11a ($p=0.0002$) a CD184 ($p=0.0075$, 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). V tomto případě byly znaky CD11a ($p=0.0040$) a CD184 ($p=0.0418$) vyjádřeny signifikantně méně na CD34+ buňkách od dobře mobilizovatelných dárců, viz tabulka 9. a obrázek 4. Spearmanova pořadová korelace potvrdila negativní vztah mezi intenzitou exprese znaku CD11a a hladinou CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 ($p=0.0050$).

4.5. 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 resp. transplantačních centrech a vzájemnou reprodukovatelnost výsledků.

Nejprve jsme retrospektivně porovnali výsledky měření CD34+ buněk v transplantátech od nepříbuzných dárců, které byly prostřednictvím ČNRDD vyměněny mezi naším transplantačním 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+ $\times 10^8$ ($p<0.0001$, $r_s=0.9434$). Dokládají grafy 19a. – 19b.

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. Vzorky byly změřeny v každé laboratoři standardním způsobem. Následně jsme porovnávali mezilaboratorní variabilitu.

Ke zhodnocení variability jsme vytvořili specifické skóre, které vychází z porovnání naměřené hodnoty ve zkoumané laboratoři k „rozptylu“ naměřených hodnot stejného vzorku mezi všemi zkoumanými laboratořemi. Skóre ukazuje, zda se hodnota naměřená v dané konkrétní laboratoři odlišuje (či neodlišuje) od hodnoty naměřené právě polovinou ostatních laboratoří a dokáže tedy porovnat odchylky měření napříč laboratořemi. Rozptyl správných hodnot zkoumaného parametru je takový interval, který je naměřen právě polovinou všech laboratoří a leží okolo střední hodnoty. Tedy rozsah „správného měření“ leží mezi 25-tým a 75-tým kvantilem. Pokud se naměřená hodnota dané laboratoře nachází uvnitř uvedeného intervalu, je měření posouzeno jako „správné“ (skóre v intervalu -1 až +1), leží-li mimo interval, je rozhodnuto o tom, že měření je „odlehlé“ (skóre mimo interval -1 až +1).

Při prvním kontrolním cyklu jsme zaznamenali značnou variabilitu měření s řadou odlehklých hodnot. Při druhém kontrolním cyklu byla již variabilita měření podstatně nižší a také průměrné skóre jednotlivých laboratoří (počítáno pro všechny parametry – WBC, CD34+ %, CD34+/ μ l - v daném kontrolním cyklu) se snížilo z 20,39 na 8,09. Detaily ukazují grafy 20a. - 20b.

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). Hemopoetické kmenové buňky mají intracelulárně vysoký obsah ALDH. Tyto buňky mohou být detekovány pomocí substrátu ALDH, který je enzymaticky přeměňován na fluorescenční produkt. Produkt se kumuluje ve viabilních buňkách a umožňuje tak měření ALDH aktivity a životnosti buněk na průtokovém cytometru. 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 (viz graf 21. a obrázek 5.), bez statisticky signifikantního rozdílu hodnot ($p < 0.0001$, $r_s = 0.9765$).

5. Diskuse

Efektivita mobilizace je dána především faktory ze strany pacienta eventuelně dárce, méně pak faktory ze strany metody odběru a kvality přístroje. Faktory ze strany pacienta/dárce jsou velmi pestré (viz bod. 1.7.). Bohužel žádný z nich není schopen spolehlivě a samostatně předpovídat výsledek mobilizačního pokusu, a proto je třeba tyto ukazatele vždy posuzovat komplexně.

5.1. 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 (56). Výsledek mobilizace je určen také typem chemoterapie podané v rámci standardní léčby malignity. Drake sestavil skórovací systém založený na „stem cell toxicitě“ jednotlivých cytostatik a doložil, že expozice pacienta cytostatikům s vysokým skóre limituje budoucí mobilizaci, a že použití takovýchto cytostatik by mělo být před plánovanou indikací k odběru autologního transplantátu minimalizováno (57). Některá cytostatika jako alkylační látky, purinová analoga prokazatelně snižují pravděpodobnost úspěšné mobilizace.

Fludarabin patří mezi základní cytostatika používaná k léčbě CLL. Cytostatikum je uváděno jako jedna z příčin špatných mobilizačních výsledků u těchto pacientů (58, 59). V některých citovaných souborech však byla řada pacientů předléčena dalšími chemoterapiemi, které mohou negativně ovlivňovat odběr HSC (60). Naopak existují práce dokládající úspěšnou mobilizaci pacientů léčených pouze fludarabinem ve srovnání s pacienty léčenými ještě jinými liniemi chemoterapie (61). Řada autorů potvrzuje, že předchozí léčba fludarabinem nebrání úspěšnému získání autologního transplantátu (62). 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 (61, 63). 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. Ostatní sledované parametry – doba od diagnózy, počet cyklů fludarabinu, stav

onemocnění resp. postižení kostní dřeně před mobilizací – neměly na výsledek mobilizace vliv. Tato skutečnost může být ovšem modifikována tím, že všichni pacienti dostali stejný počet cyklů fludarabinu (medián 4 cykly). Intenzita úvodní chemoterapie musí být tedy vyvážená. Na jedné straně by měla umožnit dosažení maximální léčebné odpovědi, minimalizaci nádorové infiltrace kostní dřeně a tím pádem získání štěpu bez nádorové kontaminace. Na druhé straně by neměla její toxicita limitovat mobilizační pokusy.

Výrazně nepříznivý efekt na mobilizovatelnost má radioterapie. Z tohoto důvodu je vhodné zařadit ji až na závěr léčebného plánu a provést odběr autologního transplantátu ještě před ozářením.

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 cca 110 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.

5.2. 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. Někteří autoři prokázali vyšší efektivitu G-CSF při jeho aplikaci ve dvou denních dávkách. Kröger ve své crossover studii zaznamenal u dárců signifikantní nárůst hladiny CD34+ buněk po čtvrté dávce filgrastimu rozdělené do dvou denních dávek (64). Tento způsob podávání je však pro dárce méně pohodlný a vzhledem k tomu, že by aplikace měla být vždy v rukou zdravotníka, i obtížně realizovatelný. Množství CD34+ buněk je ovlivňováno samozřejmě i dávkou filgrastimu. Dávky \sim 10 μ g/kg/den nebo vyšší jsou efektivnější než dávky kolem 5 μ g/kg/den (65, 66, 67). V současné době je standardním a všeobecně akceptovaným dávkováním 10 μ g/kg/den, vyšší dávky se nedoporučují pro výrazný nárůst projevů akutní toxicity filgrastimu 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 µg/kg/den). Menší výtěžky CD34+ buněk, uváděné při odběru žen v porovnání s muži (67, 68), 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 (69).

Při hodnocení laboratorních dat lze u zdravých dárců také vysledovat vztah hladiny mobilizovaných CD34+ buněk k některým parametrům krevního obrazu. Hodnota leukocytů event. trombocytů před stimulací koreluje v některých pracích s hodnotou cirkulujících progenitorů (67, 69). Naše multicentrická data tuto analýzu bohužel neumožnila.

Hladina CD34+ buněk ovšem korelovala u našich dárců pozitivně předodběrovými hladinami leukocytů s trombocytů. Tuto závislost potvrdili i jiní autoři (70). Přes tento vztah mezi hladinou leukocytů a CD34+ buněk se nejeví samotná hodnota leukocytů jako vhodný parametr pro rozhodování o zahájení leukeferez 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. Stuart ve své studii - na souboru dárců s mediánem věku 38 let - označil 2 % dárců jako neschopné získat minimální štěp (68). Lze předpokládat že s rostoucím věkem se podíl obtížně mobilizovatelných dárců zvyšuje a roste riziko získání suboptimálního transplantátu (blíže viz. bod 5.3.).

5.3. 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. Indikace zahrnují nejen akutní leukémie, ale také chronická maligní onemocnění jako lymfomy, chronickou lymfatickou leukémii eventuálně mnohočetný myelom. Výsledky této léčby jsou velmi povzbudivé a dosahují více než 50 % dvouletého přežití u akutní myeloidní leukémie (71, 72) a přes 70 % dlouhodobého přežití u chronické lymfatické leukémie (73).

Léčba hemato-onkologických nemocných vyššího věku s sebou nese 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 (67, 69, 74 - 76), jiní autoři tuto skutečnost nepotvrzují (77 - 80). 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 nasádat minimální dávku - 2×10^6 /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. V rámci jednotlivých věkových skupin, analyzovaných odděleně, však tento vztah již nebyl dle očekávání statisticky významný. Také podle jiných prací je ve věkové skupině pod 50 let riziko nedostatečné mobilizace méně pravděpodobné (68).

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.

Věk dárce je jedním non-HLA faktorů ovlivňujících výsledek transplantace. Proces vyhledávání dárce by měl zahrnovat jak optimální HLA shodu tak ostatní non-HLA faktory včetně věku. Ukazuje se, že dlouhodobé přežití po nepříbuzenecké alogenní transplantaci s mladým plně HLA kompatibilním dárce je minimálně stejné jako při použití staršího příbuzného dárce (81). Využití mladého nepříbuzného dárce může dokonce dle některých prací snížit riziko GVHD a zlepšit výsledek transplantace (81, 82). Typ dárce se již nezdá být pro alogenní transplantace starých pacientů zásadním prognostickým faktorem (83, 84). Hlavní vliv na výsledek léčby má v době HLA typizace využívající vysokého rozlišení nikoliv věk dárce, ale jiné prognostické faktory jako cytogenetika, stav onemocnění atd. Samozřejmě vyhledávání nepříbuzného dárce není vždy možné nebo efektivní a starší příbuzný genoidentický sourozenec zůstává často jediným dostupným dárce. Přesto by search k ověření dostupnosti nepříbuzného dárce měl být zvažován, zejména u pacientů s frekventními HLA fenotypy.

Vliv věku se jako jeden z předmobilizačních faktorů 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 (85). Také my jsme pozorovali negativní korelaci věku s hladinou CD34+ buněk u pacientů s CLL.

5.4. 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 g/m²), 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 (56). Maximálních hladin CD34+ buněk v našich souborech pacientů mobilizovaných kombinací cyklofosfamid plus G-CSF bylo v periferní krvi dosahováno ve dnech 9 – 12.

Z těchto důvodů je jedinou cestou individuální určení optimálního dne odběru založené na denní monitoraci krevního obrazu a CD34+ buněk, namísto pevně stanoveného dne očekávané efektivní mobilizace pro daný stimulační režim.

Zdraví dárce dosahují při mobilizaci pomocí G-CSF maximální hladiny leukocytů v den +6 a maximální hladiny CD34+ buněk v den +5 eventuálně +6 (65, 66, 86). Podobná kinetika vyplývá i z naší předchozí analýzy (76). K maximálnímu vzestupu hladiny CD34+ buněk docházelo mezi dny +4 a +5. Optimální načasování první aferery je na den +5, při potřebě dvou aferez následuje další odběr v den +6, kdy je hladina CD34+ buněk sice nižší než v den +5, ale stále převyšuje hodnoty ze dne +4.

5.5. Nežádoucí účinky mobilizace G-CSF a aferozy

Při odběru zdravých dárců – příbuzných i nepříbuzných – je prioritou číslo jedna ochrana zdraví dárce a minimalizace rizika komplikací plynoucích z darování. Na rozdíl od pacientů, kde jsou procedury související s odběrem autologních HSC jedním z mnoha rizik vyplývajících ze základního onemocnění a jeho léčby, podstupuje zdravý dárce v souvislosti s darováním zdravotnické výkony, které sám

nepotřebuje. Proto je na prevenci a monitorování eventuálních nežádoucích účinků darování kladen mimořádný důraz.

Mírnou akutní toxicitu G-CSF (grade 1 dle CTC NCI), která se projevuje především bolestmi kostí a svalů a únavou, udává až 80 % dárců/pacientů (47). 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 (31). Každopádně pouze 1 % komplikací bylo hodnoceno jako závažné, což odpovídá literárním údajům i datům z registrů dárců (31, 87).

Nežádoucí reakce spojené s mobilizací a odběrem CD34+ buněk jsou zpravidla porovnávány s rizikem odběru kostní dřeně. Afereza se jeví jako méně invazivní v porovnání s aspirací kostní dřeně a celkovou anestézií. Je ovšem potřeba skutečně podrobně zhodnotit zdravotní stav dárce v průběhu procesu posuzování jeho zdravotní způsobilosti a dle potřeby rozšířit standardní vyšetřovací postup o další metody a testy, které si vyžádá zhodnocení anamnézy dárce resp. jeho další přidružené choroby. Filgrastim může například interferovat s koagulačními funkcemi a potencionálně stimulovat výskyt trombotických a vaskulárních příhod (88), což si musíme uvědomit zejména u dárců s projevy aterosklerózy.

Zvláštní skupinou 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 (89). 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. Mohou podstoupit darování s relativně nízkým rizikem bez ohledu na jejich komorbidity. Ovšem u všech starších dárců by měla být posouzena nejen jejich 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 frekventnější a pestřejší a vyplývají z myelotoxicity stimulační chemoterapie, přechodné pancytopenie i základního onemocnění a jeho předchozí léčby. Jejich porovnání je při pestrosti stimulačních režimů obtížné a ani literatura je komplexně neuvádí.

5.6. 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 k zodpovězení této otázky je třeba využít data z registrů dárců, které koncentrují velké množství dárců resp. odběrů a dlouhodobě je sledují.

Největší americký registr dárců (NMDP) informoval o souboru cca 4000 dárců sledovaných minimálně rok po odběru (pouze 897 dárců déle než 4 roky), mezi kterými se vyskytlo 20 případů nádorových onemocnění různých orgánů. Neobjevila se žádná hematologická malignita (90). Německý registr dárců (DKMS) při vyhodnocení skupiny cca 7000 dárců odebraných po stimulaci G-CSF nezjistil zvýšený výskyt malignit (91). Také EBMT nenalezla při retrospektivním vyhodnocení dat alogenních dárců odebraných v letech 1990 až 2003 rozdíly ve výskytu hematologických malignit mezi dárce kostní dřeně a periferních kmenových buněk (92).

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 (93).

Při použití dat z registrů s velkými počty dárců 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 (z jednoho centra i registrů dárců) je omezená doba sledování, která zřídka výrazněji přesahuje jeden rok. Tím se snižuje výpovědní hodnota dat i přes velké počty sledovaných jedinců v těchto souborech. 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 (94). Dosavadní data tedy mohou být nepřesná. Situaci ztěžuje také fakt, že dlouhodobý kontakt s dárci je často z různých důvodů problematický. Obecně jsou pro detekci takto malého rizika vzniku nádorového onemocnění potřeba velké soubory dárců a kvalitní data z registrů tak představují jedinou alternativu.

5.7. Prediktivní význam cytokinů

Mechanismy a regulace homingu a uvolňování hemopoetických kmenových buněk do- a z kostní dřeně, které zahrnují komplex interakcí mezi adhezivními molekulami, chemokiny, cytokiny, proteolytickými enzymy, stromálními, endoteliálními a hemopoetickými buňkami, nejsou dosud zcela prostudované. Jejich odhalení nám pomáhá pochopit, proč někteří jedinci mobilizují dostatečná množství CD34+ buněk a jiní nikoliv, a dává nám možnost hledat nové cesty a nové postupy umožňující zvýšit efektivitu mobilizace.

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 α , jiné analyty jako TNF- α zůstávají beze změny (95 - 98). Podobnou dynamiku měly tyto analyty i v naší analýze, pouze TNF- α měl tendenci k vzestupu. MMP-9 se při mobilizaci kumuluje v kostní dřeni i plazmě. Solubilní adhezivní molekuly (sVCAM-1, sICAM-1) jsou odštěpovány z povrchu stromálních buněk a následně se zvyšuje jejich hladina v periferní krvi. G-CSF dále snižuje sekreci a koncentraci SDF-1 α v kostní dřeni (99, 100) a velikost tohoto poklesu odpovídá rozsahu HSC mobilizace (23).

Dosquetová našla u pacientů s mnohočetným myelomem stimulovaných chemoterapií plus G-CSF vztah mezi hladinou CD34+ buněk a sVCAM-1 v den aferezy (101). Naš soubor potvrdil tuto pozitivní závislost a zároveň ukázal negativní korelaci platnou pro IL-6.

IL-8 se spolupodílí na spouštění migrace HSC z kostní dřeně do periferní cirkulace. Podle Watanabeho hladina IL-8 stoupá působením G-CSF a odpovídá množství CD34+ buněk v periferní krvi (102). Tuto závislost ovšem jiní autoři nepotvrzují

(101). V našem souboru IL-8 dokonce klesal (a jeho hladina byla signifikantně nižší u obtížně mobilizovatelných dárců) a informace o jeho dynamice jsou tedy značně kontroverzní. Rozdílné závěry mohou být také ovlivněny volbou vstupního materiálu pro multiplexovou analýzu. V našich korelačních experimentech jsme pro IL-8 prokázali významně vyšší koncentrace IL-8 v séru ve srovnání s EDTA plazmou (sérum/plazma index 7.66), viz graf 22.

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 sloužit k prospektivní identifikaci dárců nebo pacientů, kteří se pravděpodobně budou obtížně mobilizovat (zejména v kombinaci s vyšším věkem dárce), a umožnit tak rozhodnutí o volbě vhodnějšího mobilizačního protokolu – vyšší dávka filgrastimu, kombinace cytokinů, nové mobilizační molekuly atd.

5.8. Prediktivní význam adhezivních molekul

Adhezivní molekuly na povrchu CD34⁺ buněk se účastní procesu mobilizace HSC. Mobilizace vyvolaná G-CSF vede ke změnám exprese některých těchto antigenů. Mobilizace je spojena s down-regulací CD44, CD49d (VLA-4), CD184 (CXCR4) na CD34⁺ buňkách v kostní dřeni ve srovnání se stavem před mobilizací a jejich uvolněním z kostní dřene do periferní krve (103). Exprese CD49d a CD11a (LFA-1) na CD34⁺ buňkách kostní dřene se snižuje po jejich mobilizaci do periferní krve resp. aferézního produktu (103, 104 - 106). Také exprese CD184 je vlivem G-CSF na cirkulujících progenitorech redukována (10, 107). Intenzita exprese adhezivních molekul CD11a, CD49d i CD62L před- a po aplikaci G-CSF zdravým dárcům je významně omezena (108).

Některé práce prokazují negativní korelaci exprese CD49d s množstvím mobilizovaných CD34⁺ buněk (109). Naše data tuto skutečnost nepotvrzují, nicméně sníženou expresi na CD34⁺ buňkách dobře mobilizovatelných dárců jsme zaznamenali u antigenů CD184 a CD11a.

Řada prací tedy prokazuje inverzní vztah mezi expresí adhezivních molekul na CD34⁺ buňkách a kvalitou mobilizace. Snížení exprese těchto antigenů na

mobilizovaných CD34+ buňkách odpovídá snížené adhezi k dřevému stromatu. HSC dobře mobilizovatelných dárců exprimují méně intenzivně tyto molekuly (především CD49d, CD184) než je tomu u špatně mobilizovatelných jedinců. Naše výsledky dokládají negativní korelaci pro CD184 a CD11a, nikoliv však pro CD49d. Bohužel žádný z těchto parametrů neumožňuje samostatně dostatečně spolehlivou predikci výsledku mobilizace.

5.9. 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 (110), 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 (111, 112). Naše limitovaná zkušenost s remobilizací pomocí vysocedávkovaného G-CSF u 11 špatně mobilizovatelných pacientů s chronickou lymfatickou leukémií bohužel ukázala malou efektivitu tohoto postupu - u žádného nemocného se nepodařilo získat dostatečný transplantát. Příčinou je pravděpodobně předlčení fludarabinem, které brání úspěšné mobilizaci G-CSF bez ohledu na interval od iniciační léčby. 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 (113, 114).

Jako nadějnější se jeví použití intenzivnější chemoterapie v kombinaci s filgrastimem. Kombinované chemoterapie jako DexaBEAM, IVE, HAM atd. mohou být řešením pro část špatně mobilizovatelných pacientů. Jejich použití nabízí u refrakterních či relabujících lymfomů cca 90 % šanci na optimální mobilizaci ve srovnání s cca 70 % pravděpodobností u „klasického“ mobilizačního cytostatika tedy cyklofosfamidu a získaná množství CD34+ buněk jsou až dvojnásobně vyšší (115, 116). Tyto protokoly jsou ovšem výrazně myelosupresivní a je třeba počítat s prodlouženou kinetikou mobilizace, s vyšším výskytem infekčních komplikací a větší morbiditou (116).

Pacienti s mnohočetným myelomem mohou profitovat z tandemových autologních transplantací. Pokud se z důvodu suboptimální mobilizace podaří nastřádat pouze jeden autologní transplantát, je teoreticky možné se pokusit o novou aferezu v době rekonstituce krvetvorby po vysocedávkované chemoterapii a první transplantaci. Schwella dokázal ve svém souboru provést druhou sérii aferéz a získat druhý transplantát u 80 % pacientů přihojících se po první autologní transplantaci. Kvalita druhého transplantátu byla sice nižší ($3.6 \times 10^6/\text{kg}$ vs. $6.4 \times 10^6/\text{kg}$), nicméně dostatečná pro provedení druhé transplantace (117). Dřívější zkušenosti naší pracovní skupiny tuto možnost potvrzují. 33 % pacientů v našem souboru vyplavilo v době přihojení dostatečné množství CD34+ buněk ($\geq 10/\mu\text{l}$ minimálně dva dny po sobě) slibující získání minimálního štěpu (118). Ve Schwellově i naší analýze však byly úspěšné potransplantační mobilizace zaznamenány u pacientů, kterým byl transplantován bohatý štěp (6.5 vs. $2.5 \times 10^6/\text{kg}$ resp. 9.66 vs. $4.65 \times 10^6/\text{kg}$), takže využitelnost tohoto postupu u skutečných „poor mobilizers“ je sporná.

5.10. Postup u „poor mobilizers“

Namísto „ex post“ řešení neúspěšných mobilizací se jako ideálnější jeví postup prospektivní identifikace rizikových pacientů nebo dárců pomocí vhodných prediktivních faktorů. Tím je teoreticky možné modifikovat předem mobilizační schéma a eventuálně využít nové mobilizační molekuly.

V případě zdravých dárců je aktuálně jedinou možností řešení nedostatečné mobilizace zvýšení dávky G-CSF nebo doplnění odběru kostní dřeně. Také zde by identifikace vhodného predikátoru, například hladiny určitého chemokinu stanovené před mobilizací, mohla pomoci včas reagovat a zvolit vhodný typ odběru nebo upravit dávkování G-CSF.

Dosud je toto prospektivní odhalování špatně mobilizovatelných jedinců často obtížné a jakýkoliv další prediktivní faktor, může zvýšit naši schopnost reagovat dříve než v době očekávaného vzestupu CD34+ buněk a aferéz.

5.11. 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. Zdrojem variability jsou způsob zpracování vzorku,

použité reagentie, použitý cytometrický protokol a analýza dat a samozřejmě i zkušenost laboratoře. Před zavedením standardizovaných protokolů byly rozdíly naměřených hodnot CD34+ buněk mezi laboratořemi v řádu desítek procent (119). Akceptováním jednotných protokolů, především tzv. ISHAGE platformy (36), a implementací systémů externí kontroly kvality došlo k výraznému omezení mezilaboratorní variability (37). 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 (120). 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. Výstupem je nejenom kontrola a zlepšení reprodukovatelnosti a porovnatelnosti výsledků, ale tyto aktivity slouží také pro testování způsobilosti pracovníků cytometrických laboratoří.

Nevýhodou obvykle používaných ukazatelů kvality transplantátu – obsah CD34+ buněk a viabilita – je skutečnost, že nevypovídají o růstovém potenciálu štetu. 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. Avšak při poškození buněk – např. nevhodným transportem – zůstává exprese CD34+ znaku zachována, ale obsah ALDH pozitivních buněk klesá, což se projevuje zhoršenou růstovou funkcí a opožděným rozvojem dárcovského chimerismu (121). Jiným proliferačním testem je luminiscenční stanovení intracelulární koncentrace ATP v kmenových buňkách, která se mění při jejich proliferaci (122).

5.12. Mobilizace v regenerativní medicíně

Problematika mobilizace kmenových buněk krvetvorby proniká také mimo oblast hemato-onkologie. Řada autorů zabývajících se regenerativní medicínou prokazuje, že po poškození některých nehematopoetických orgánů dochází k mobilizaci HSC do

periferní krve. Stimulem může být chirurgický výkon – po resekci jater dochází ke zvýšení hladiny CD34+ buněk v periferní krvi (6.5 versus 0.7 buněk/ μ l u kontrolní skupiny), nebo ischemická léze, která vede k uvolnění signálů pro mobilizaci kmenových buněk krvetvorby (123, 124). Bohužel léčebné využití aplikace G-CSF je v těchto situacích zatím spíše zklamáním a nejsou také zodpovězeny důležité otázky načasování, dávkování i vlastního mechanismu účinku (přímý projektivní účinek vs. zprostředkovaný mobilizací HSC) růstového faktoru. Lze očekávat nové studie využívající kombinace růstových faktorů nebo kombinace cytokinů s přímou aplikací kmenových buněk do postižené tkáně.

6. Závěry

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

- 6.1. 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
- 6.2. 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.**
- 6.3. 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.**
- 6.4. 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 kinetiky je hlavním vodítkem umožňujícím správné načasování aferéz.**
- 6.5. 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.

- 6.6. 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.
- 6.7. IL-6 a sICAM-1 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.
- 6.8. 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.
- 6.9. Byla zavedena nová metoda detekce hemopoetických kmenových buněk pomocí stanovení aldehyddehydrogenázy průtokovou cytometrií.

7. Poděkování

Chtěl bych poděkovat svým školitelům, především panu profesorovi MUDr. Jiřímu Horáčkovi a také panu profesorovi MUDr. Milanu Bláhovi, za jejich pomoc při postgraduálním vědeckém výzkumu.

Panu primáři MUDr. Vladimíru Kozovi velmi děkuji za dlouhodobou podporu a cenné rady při každodenní práci a při mých studijních a vědeckých aktivitách.

Dále patří můj díky všem členům kolektivu Hemato-onkologického oddělení Fakultní nemocnice Plzeň, kteří mi svým profesionálním zvládnutím svých náročných povinností a svou ochotou umožnili se věnovat vědecké práci. Zvláště chci poděkovat všem sestřičkám a laborantkám, bez jejichž pomoci tyto výsledky nemohly vzniknout.

Ocenit bych chtěl také pomoc pana Ing. Stanislava Kormundy při statistickém zpracování všech dat.

V neposlední řadě bych rád poděkoval i kolegům z jiných transplantačních center, s nimiž jsem měl nebo mám možnost spolupracovat na různých projektech.

Zvláště bych chtěl pak vyjádřit svůj dík svým nejbližším, manželce i dcerce, zejména za porozumění a pochopení pro mé časově náročné povinnosti.

8. 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. Pecora AL. Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: S7-S12.
4. Pecora AL, Preti RA, Gleim GW, Jennis A, Zahos K, Cantwell S, Doria L, Isaacs R, Gillio AP, Michelis MA, Brochstein JA. CD34+CD33- cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem cell recipients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2093-2104.
5. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter Ch, Yu M, Dunbar C, Barrett J. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996; 88: 3223-3229.
6. 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.
7. 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.
8. Yin T, Linheng Li. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006; 116: 1195-1201.
9. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116: 769-778.
10. 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.
11. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005; 106: 1901-1910.
12. 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.

13. Foudi A, Jarrier P, Zhang Y, Wittner M, Geay JF, Lecluse Y, Nagasawa T, Vainchenker W, Louache F. Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow micro environment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. *Blood* 2006; 107: 2243-2251.
14. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283: 845-848.
15. Priestley GV, Ulyanova T, Papayannopoulou T. Sustained alterations in biodistribution of stem/progenitor cells in Tie2Cre⁺α4^{fl/fl} mice are hematopoietic cell autonomous. *Blood* 2007; 109: 109-111.
16. Spiegel A, Zcharia E, Goldshmidt. Heparanase facilitates development and SDF-1 induced migration of hematopoietic stem and progenitor cell. *Blood* 2003; 102: 825a-6a.
17. Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Ayelet D, Amnon P, Sarit S, Orit K, Rami H, Ronen A, Izhar H, Herzl BH, Naor D, Navleč A, Lapidot T. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34⁺ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 2004; 103: 2981-2989.
18. Fruehauf S, Server T, Topaly J. Innovative strategies for PBPC mobilization. *Cytotherapy* 2005; 7: 438-446.
19. Christopherson KW, Cooper S, Hangoc G, Broxmeyer HE. CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26^{-/-} mice. *Exp Hematol* 2003; 31: 1126-1134.
20. Christopherson KW, Cooper S, Broxmeyer HE. Cell surface peptide CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood*; 101: 4680-4686.
21. Ballen KK, Shpall EJ, Avigan D, Yeap BY, Fisher DC, McDermott K, Dey BR, Attar E, McAfee S, Konopleva M, Antin JH, Spitzer TR. Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 838-843.
22. 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.

23. 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.
24. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, Link DC. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* 2004; 104: 65-72.
25. Winkler IG, Hendy J, Coughlin P, Horvath A, Lévesque JP. Serine protease inhibitors *serpina1* and *serpina3* are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization. *J Exp Med* 2005; 201: 1077-1088
26. Watts MJ, Addison I, Ings SJ, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, Linch DC. Optimal timing for collection of PBSC after glycosylated G-CSF administration. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 365-368.
27. Faulkner LB, Tucci F, Tamburini A, Tintori V, Lippi AA, Bambi F, Malentacca F, Azzari C, Gelli AM, Genovese F, Bernini G. G-CSF serum pharmacokinetics during peripheral blood progenitor cell mobilization: neutrophil count-adjusted dosage might potentially improve mobilization and be more cost-effective. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1091-1095.
28. Kröger N, Renges H, Krüger W, Gutensohn K, Löliger C, Carrero I, Cortes L, Zander AR. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000; 111: 761-765.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, Bridger G, Henson GW. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1667-1673.
33. Uy GL, Rettig MP, McFarland KM, Hladnik LM, Kulkarni S, Abboud CN, Casnej AF, Stockerl-Goldstein K, Vij R, Westervelt P, DiPersio JF. Mobilization and chemosensitization of AML with the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100): a phase I/II study of AMD3100+MEC in patients with relapsed or refractory disease. *Blood* 2008; 112: 1944.
34. Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 285-292.
35. Pelus LM, Fukuda S. Chemokine- mobilized adult stem cells, defining a better hematopoietic graft. *Leukemia* 2008; 22: 466-473.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Pusic I, DiPersio JF. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Design* 2008; 14: 1950-1961.
41. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis 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.
42. 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.
 43. Levesque JP, Winkler I. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 53-58.
 44. Oelschlaegel U, Ehninger G, Kroschinsky F. Differences in expression of adhesion molecules in correlation to mobilization efficacy in healthy stem cells donors investigated by flow cytometry. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33: 560.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. LeBlanc R, Roy J, Demers C, Vu L, Cantin G. A prospective study of G-CSF effects on hemostasis in allogeneic blood stem cell donors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 991-996.
 49. Nuamah NM, Goker H, Kilic YA, Dagmoura H, Cakmak A. Spontaneous splenic rupture in a healthy allogeneic donor of peripheral-blood stem cell following the administration of granulocyte colony-stimulating factor (g-csf). A case report and review of the literature. *Haematologica* 2006; 91: 9-11.
 50. Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, Storb R, Appelbaum FR, Rowley SD, Bensinger WI. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 85-89.
 51. Tassi C, Tazzari PL, Bonifazi F, Giudice V, Nannetti A, Ricci F, Rizzi S, Bandini G, Conte R. Short- and long-term haematological surveillance of healthy donors of

- allogeneic peripheral haematopoietic progenitors mobilized with G-CSF: a single institution prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2005; 736: 289-294.
52. Rauscher GH, Sandler DP, Poole C, Pankow J, Mitchell B, Bloomfield CD, Olshan AF. Family History of Cancer and Incidence of Acute Leukemia in Adults. *Am J Epid* 2002; 156: 517-526.
 53. Segel GB, Lichtman MA. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004; 32: 246-261.
 54. 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.
 55. Kathryn L, Keller, MA Iannone. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Experimental Hematology* 2002; 30: 1227-1237.
 56. 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.
 57. 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.
 58. 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.
 59. Tournilhac O, Cazin B, Leprière 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.
 60. Ketterer N, Salles G, Moullet I, Dumontet C, ElJaafari-Corbin A, Tremisi P, Thieblemont C, Durand B, Neidhardt-Berard EM, Samaha H, Rigal D, Coiffier B. Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cell in 200 patients with lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 1998; 103: 235-242.
 61. 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.
62. 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.
 63. 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.
 64. Kröger N, Sonnenberg S, Cortes-Dericks L, Freiburger P, Mollnau H, Zander AR. Kinetics of G-CSF and CD34+ cell mobilization after once or twice daily stimulation with rHu- granulocyte- stimulating factor (lenograstim) in healthy volunteer: an intraindividual crossover study. *Transfusion* 2004; 44: 104-110.
 65. 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.
 66. 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.
 67. 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.
 68. 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.
 69. 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.
70. 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.
 71. Niederwieser D, Lange T, Cross M, Basara N, Al-Ali H. Reduced intensity conditioning (RIC) haematopoietic cell transplants in elderly patients with AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 825-838.
 72. Baron F, Storb R. Hematopoietic cell transplantation after reduced-intensity conditioning for older adults with acute myeloid leukemia in complete remission. *Curr Opin Hemato* .2007; 14:145-151.
 73. Sorrow ML, Storer BE, Sandmaier BM, Maris M, Shizuru J, Maziarz R, Agura E, Chauncey TR, Pulsipher MA, McSweeney PA, Wade JC, Bruno B, Langston A, Radich J, Niederwieser D, Blume KG, Storb R, Maloney DG. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4912-4920.
 74. De la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, del Cañizo C, Brunet S, Zamora C, Diaz 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.
 75. 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.
 76. Lysák D, Koza V, Jindra P. Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. *Transfusion and apheresis science* 2005; 33: 275-283.
 77. 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.

78. Anderlini P, Przepiorka D, Lauppe J, Seong D, Giralt 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.
79. 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.
80. Tabilio A, Falzetti F, Giannoni C, Aversa F, Martelli MP, Rosetti M, Caputo P, Chionne F, Gambelunghe C, Martelli MF. Stem cell mobilization in normal donors. *J Hematother* 1997; 6: 227-234.
81. Kollman C, Howe CWS, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; 98: 2043-2051.
82. Mehta J, Gordon LI, Tallman MS, Winter JN, Evens AM, Frankfurt O, Williams SF, Grinblatt D, Kaminer L, Meagher R, Singhal S. Does younger donor age affect the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies beneficially? *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 95-100.
83. Schetelig J, Bornhäuser M, Schmid C, Hertenstein B, Schwerdtfeger R, Martin H, Stelljes M, Hegenbart U, Schäfer-Eckart K, Füssel M, Wiedemann B, Thiede C, Kienast J, Baurmann H, Ganser A, Kolb HJ, Ehninger G. Matched unrelated or matched sibling donors result in comparable survival after allogeneic stem-cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia: a report from the cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5183-5191.
84. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, Chehata S, Esperou H, Vernant JP, Michallet M, Buzyn A, Gratecos N, Cahn JY, Bourhis JH, Chir Z, Raffoux C, Socié G, Golmard JL, Jouet JP. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5695-5702.
85. 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 (\geq 70 years) with

- multiple myeloma: influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen. *Br J Haematol* 2003; 120: 413-423.
86. 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.
 87. 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.
 88. Canales MA, Arrieta R, Gomez-Rioja R, Diez J, Jimenez-Yuste V, Hernandez-Navarro F. Induction of a hypercoagulability state and endothelial cell activation by granulocyte colony-stimulating factor in peripheral blood stem cell donors. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11: 675-681.
 89. 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.
 90. Confer D, Miller JP. Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. *Br J Haematol* 2006; 137: 77-78.
 91. 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.
 92. 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.
 93. Lysák D, Navrátilová J. G-CSF u zdravých dárců. Bezpečný nebo škodlivý ? *Trans Hemat dnes* 2007; 13: 148-152.
 94. Hasenclever D, Sextro M. Safety of AlloPBPC donors: biometrical considerations on monitoring long term risks. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: S28-S30.
 95. 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.

96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. Juarez J, Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol* 2004; 19: 299-309.
100. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 3: 678-694.
101. 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.
102. Watanabe T, Kawano Y, Kanamaru S, Onishi T, Kaneko Y, Wakata Y, Nakagawa R, Makimoto A, Kuroda Y, Takaue Y, Talmadge JE. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony- stimulating factor- induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood* 1999; 93: 1157-1163.
103. 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.
104. Ford CD, Greenwood J, Anderson J, Snow G, Petersen FB. CD34+ cell adhesion molecule profiles differ between patients mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor alone and chemotherapy followed by granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion* 2006; 46: 193-198.
105. 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.

106. Möhle R, Murea S, Kirsch M, Haas R. Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34⁺ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF- enhanced recovery. *Exp Hematol* 1995; 23: 1535-1542.
107. Oelschlaegel U, Bornhauser M, Boxberger S, Kroschinsky F, Illmer T, Hoelig K, Calandra G, Ehninger G, Platzbecker U. Kinetics of CXCR-4 and adhesion molecule expression during autologous stem cell mobilization with G-CSF plus AMD3100 in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2007; 86: 569-573.
108. 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.
109. 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 CD34⁺ cells. *J Hematother Stem Cell Res* 1999; 8: 539-546.
110. Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: S29-S33.
111. 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.
112. 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.
113. Tournilhac O, Cazin B, Leprêtre S, Diviné 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
114. 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
115. McQuaker IG, Haynes AP, Stainer C, Anderson S, Russell NH. Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma: superior yield of progenitor cells following a salvage regiment comprising ifosfamide, etoposide and epirubicin compared to intermediate cyclophosphamide. *Br J Haematol* 1997; 98: 228-233.
 116. Russell NH, McQuaker G, Steiner C, Byrne JL, Haynes AP. Stem cell mobilization in lymphoproliferative diseases. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 935-940.
 117. Schwella N, Braun A, Ahrens N, Rick O, Salama A. Leukapheresis after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a novel approach to harvest a second autograft. *Transfusion* 2003; 43: 259-264.
 118. 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.
 119. 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.
 120. 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.
 121. Lioznov MV, Freiberger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 909-914.
 122. Reems JA, Hall KM, Gebru LH, Taber G, Rich IN. Development of a novel assay to evaluate the functional potential of umbilical cord blood progenitors. *Transfusion* 2008; 48: 620-628.
 123. De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Mason P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 805-810.
 124. Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration: a novel treatment option for acute myocardial infarction. *Cardiol Rev* 2009; 17: 1-9.

125. Zelenetz AD, Hamlin P, Kewalramani T, Yahalom J, Nimer S, Moskowitz CH. Ifosfamide, carboplatin, etoposide (ICE)-based second-line chemotherapy for the management of relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2003;14 Suppl 1: 5-10.
126. Petit J, Boqué C, Cancelas JA, Sarrà J, Muñoz J, Garcia J, Grañena A. Feasibility of ESHAP + G-CSF as peripheral blood hematopoietic progenitor cell mobilization regimen in resistant and relapsed lymphoma: a single-center study of 22 patients. *Leuk Lymphoma* 1999 Jun; 34: 119-127
127. Haas R, Moos M, Möhle R, Döhner H, Witt B, Goldschmidt H, Murea S, Flentje M, Wannemacher M, Hunstein W. High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: 149-155
128. Kröger N, Zeller W, Fehse N, Hassan HT, Krüger W, Gutensohn K, Lölliger C, Zander AR. Mobilizing peripheral blood stem cells with high-dose G-CSF alone is as effective as with Dexa-BEAM plus G-CSF in lymphoma patients. *Br J Haematol.* 1998; 102: 1101-1106.
129. de Latour RP, Chaoui D, Bourhis JH, Belhocine R, Park S, Legrand O, Brault P, Rio B, Heshmati F, Assouad S, Decaudin D. Mobilization of peripheral blood progenitor cells after DHAP regimen with or without rituximab: a large multicenter comparative study in patients with malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48: 897-904.

9. Přílohy (tabulky, grafy a obrázky)

Tabulka 1. Soubor pacientů s CLL mobilizovaných kombinací chemoterapie a G-CSF

Charakteristiky v době mobilizace (den +0). *Nepárový T- test, Mann-Whitney test.*

	všichni pacienti (n=56)	dobře mobilizovatelní (n=23)	špatně mobilizovatelní (n=33)	p
věk v době mobilizace	56 (35-68)	52 (45-67)	57 (35-68)	ns
pohlaví (muži : ženy)	44:12	19:4	25:8	ns
stadium onem. při dg. (Rai)				
0- 2	43	20	23	ns
≥ 3	13	3	10	
předchozí léčba chlorambucilem (počet cyklů)	7	2	5	ns
počet cyklů FLU + CY	4 (3-6)	4 (3-6)	4 (3-6)	ns
doba od diagnózy do mobilizace (měsíce)	11 (5-67)	12 (3-66)	10 (5-67)	ns
interval mezi poslední chemoterapií a mobilizací (dny)	77 (35-242)	79 (35-198)	76 (39-242)	ns
< 2 měsíce (pac.)	12	1	11	0.0098
> 2 měsíce (pac.)	44	22	22	
kvalita remise před mobilizací*				
CR	16	5	11	ns
nPR/PR	40	18	22	
hodnoty KO před mobilizací				
leukocyty (x 10 ⁹ /l)	5.2	6.3 (2.4-14.8)	4.5 (2.5-9.0)	0.0062
trombocyty (x 10 ⁹ /l)	143	164 (71-418)	140 (58-248)	0.0093
hemoglobin (g/l)	139	145 (113-174)	135 (95-154)	0.0054
peak CD34+ v periferní krvi (bb./μl)	8.5	25 (11-262)	3.4 (0.2-9.6)	<0.000 1
CD34+ výtěžek (x 10 ⁶ /kg)		3.3 (2.15-17.4)	NA	

*CR = kompletní remise, nPR = nodulární parciální remise, PR = parciální remise, NA = not applicable

Tabulka 2. Soubor pacientů s MM mobilizovaných kombinací chemoterapie a G-CSF
 Charakteristiky v době mobilizace (den +0). *Nepárový T- test, Mann-Whitney test, Fischerův exaktní test.*

	všichni pacienti	skupina A	skupina B	p
pacienti	73	52	21	
muži/ženy	41/32			
věk, medián	56 (36 – 70)	55	56	ns
hemoglobin (g/l), medián	122 (76 – 155)	126	116	0.0363
trombocyty ($\times 10^9/l$), medián	238 (137 – 472)	237	251	ns
předlčení alkylačními cyto				
ano	68 (93 %)			
ne	5 (7 %)			
doba od dg. do mobilizace (měsíce), medián		5.0 (3.5 – 126.7)	4.8 (3.3 – 58.5)	ns
postižení kostní dřeně (%)	4 (1 – 80)	3	5	ns
stav onemocnění				
CR	10 (14 %)	7	3	ns
< CR	63 (86 %)	45	18	ns
doba od diagnózy (měsíce)	5 (2 – 126)	5	5	ns

Tabulka 3. Soubor zdravých dárců mobilizovaných filgrastimem

Demografická data a parametry krevního obrazu v den +5 mobilizace. *Nepárový T- test, Mann- Whitney test, Fischerův exaktní test.*

	≥ 50 let (n=103)	< 50 let (n=121)	p
věk (roky, medián)	59 (55-75)	29 (17-48)	na
pohlaví (muži : ženy)	1.3 : 1	2.4 : 1	0.0379
hmotnost (kg)	83	75	0.0448
G-CSF dávka (μg/kg/day)	13 (8 – 17)	10.8 (8.5 – 16)	0.0017
parametry KO den +5 (průměry)			
leukocyty (x 10 ⁹ /l)	43.2	41.7	ns
trombocyty (x 10 ⁹ /l)	160	206	< 0.0001
CD34+ buňky (x 10 ⁶ /l)	45	81	< 0.0001
centrální žilní katétr	43 (42 %)	32 (26 %)	0.0156
komorbidity	56 (54 %)	7 (6 %)	< 0.0001
nežádoucí účinky G-CSF	42 (41 %)	60 (49 %)	ns

Tabulka 4. Parametry leukaferéz u zdravých dárců

Nepárový T- test, Mann- Whitney test.

průměr	≥ 50 let (n=103)	< 50 let (n=121)	p
zpracovaný objem krve (ml)	13 3000	14 840	< 0.0001
čas procedury (min)	246	240	ns
komplikace aférezы	30 (29 %)	18 (15 %)	0.0096
spotřeba ACD-A (ml)	786	1061	< 0.0001
hladina trombocytů po 1. afézeze (x 10 ⁹ /l)	136	154	0.0013

Tabulka 5. Detaily aferézních produktů u pacientů s mnohočetným myelomem*Nepárový T- test, Mann- Whitney test.*

	všichni pacienti	skupina A	skupina B	p
počet aferez	118	71	47	
počet aferez na pacienta	1,6	1 (1-2)	2 (2-3)	
$\geq 4 \times 10^6$ /kg CD34+ pomoci:				
1 aferezy	33 pac.	33 (63 %)	0 (0 %)	
2 aferez	34 pac.	19 (37 %)	15 (71 %)	
> 2 aferez	6 pac.	0 (0 %)	6 (29 %)	
den 1. aferezy, medián		10 (8-15)	11 (9-13)	
hodnoty KO při 1. afereze, medián				
leukocyty x 10^9 /l	11.1 (2.3-33.7)	12.6	7.0	ns
trombocyty x 10^9 /l	69 (10-205)	71	42	0.0489
CD34+/ μ l	71 (10-500)	97	28	0.0001
CD34+ x 10^6 /kg, medián	9.0	9.7	6.7	0.0001
NC x 10^8 /kg, medián	6.0	5.5	7.0	

Tabulka 6. Výsledky aferez u zdravých dárců s ohledem na věk dárce*Chi- kvadrát test*

průměr	≥ 50 let (n=103)	< 50 let (n=121)	p
CD34+ x 10^6 /kg dárce/1. afereza	2.72	4.81	< 0.0001
CD34+ x 10^6 /kg dárce/litr zpracované krve	0.21	0.33	0.0004
celková dávka CD3+ x 10^{10}	2.56	1.88	0.0051
CD34+ $\geq 4 \times 10^6$ /kg příjemce	67 (65 %)	98 (81 %)	0.0069
CD34+ < 2×10^6 /kg příjemce	7(7 %)	1 (0.8 %)	0.0164
1 afereza k dosažení cílové dávky	9 (9 %)	47 (39 %)	< 0.0001

Tabulka 7. Změny hladiny cytokinů vyvolané aplikací G-CSF zdravým dárčům

Porovnávány jsou hodnoty ze dne +0 (před stimulací) a ze dne +5 (pátý den aplikace filgrastimu). *Wilcoxonův párový test.*

	medián	špatně mobilizovatelní (n=13)	dobře mobilizovatelní (n=47)	p	
den+0	SDF-1	1917,0	1798,1	ns	pg/mL
	ICAM	89,3	112,4	0,0369	ng/mL
	VCAM	854,5	819,9	ns	ng/mL
	MMP_9	109358,2	88601,5	ns	pg/mL
	IL-6	32,0	17,8	0,0776	pg/mL
	IL-8	24,9	14,0	ns	pg/mL
	fractalkine	32,0	32,0	ns	pg/mL
	TNF-a	32,0	10,8	ns	pg/mL
	VEGF	92,3	124,8	ns	pg/mL
	E-selectin	27,9	22,7	ns	ng/mL
	medián	špatně mobilizovatelní (n=13)	dobře mobilizovatelní (n=47)	p	
den+5	SDF-1	1464,5	1570,0	ns	pg/mL
	ICAM	122,9	176,6	0,0023	ng/mL
	VCAM	947,3	1152,7	0,0117	ng/mL
	MMP_9	131892,1	156147,6	ns	pg/mL
	IL-6	32,0	22,7	ns	pg/mL
	IL-8	32,0	8,8	0,0369	pg/mL
	fractalkine	32,0	32,0	ns	pg/mL
	TNF-a	14,3	19,1	ns	pg/mL
	VEGF	76,3	123,6	ns	pg/mL
	E-selectin	49,8	52,2	ns	ng/mL

Tabulka 8. Procento exprese některých adhezivních molekul na povrchu CD34+ buněk v PB v den +5

Průměrná procenta exprese adhezivních molekul na CD34+ buňkách se mezi skupinami dobře a špatně mobilizovatelných dárců nelišila. *Wilcoxonův párový test.*

% exprese (průměr)	špatně mobilizovatelní (n=13)	dobře mobilizovatelní (n=47)	p
CD11a	92.4	85.7	ns
CD184	96.2	91.6	0.0654
CD44	99.9	99.9	ns
CD117	60.0	54.1	ns
CD26	30.9	27.9	ns
CD49d	93.3	93.9	ns

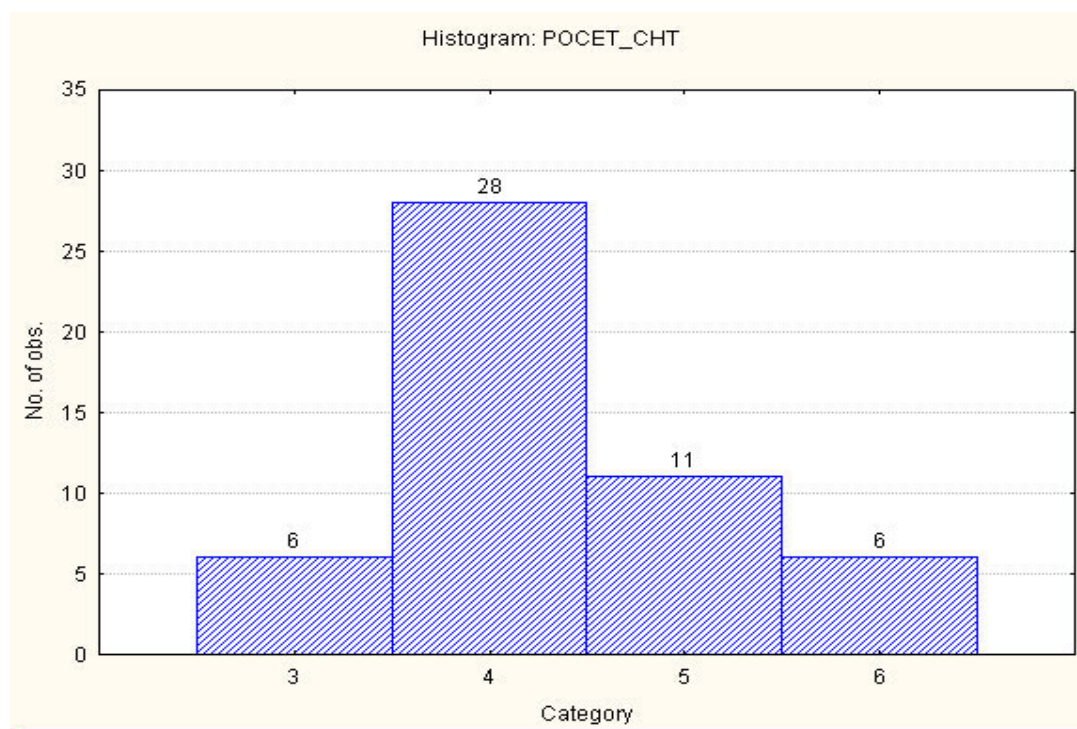
Tabulka 9. Intenzita exprese některých adhezivních molekul na povrchu CD34+ buněk v PB v den +5

Medián intenzity exprese adhezivních molekul – CD11a a CXCR4 – byl signifikantně nižší u dobře mobilizovatelných dárců. *Wilcoxonův párový test.*

intenzita (MIn) exprese (medián)	špatně mobilizovatelní (n=13)	dobře mobilizovatelní (n=47)	p
CD11a	4.90	3.15	0.0040
CD184	4.17	3.71	0.0403
CD44	35.60	37.90	ns
CD117	2.37	2.15	ns
CD26	0.93	0.93	ns
CD49d	3.57	3.27	ns

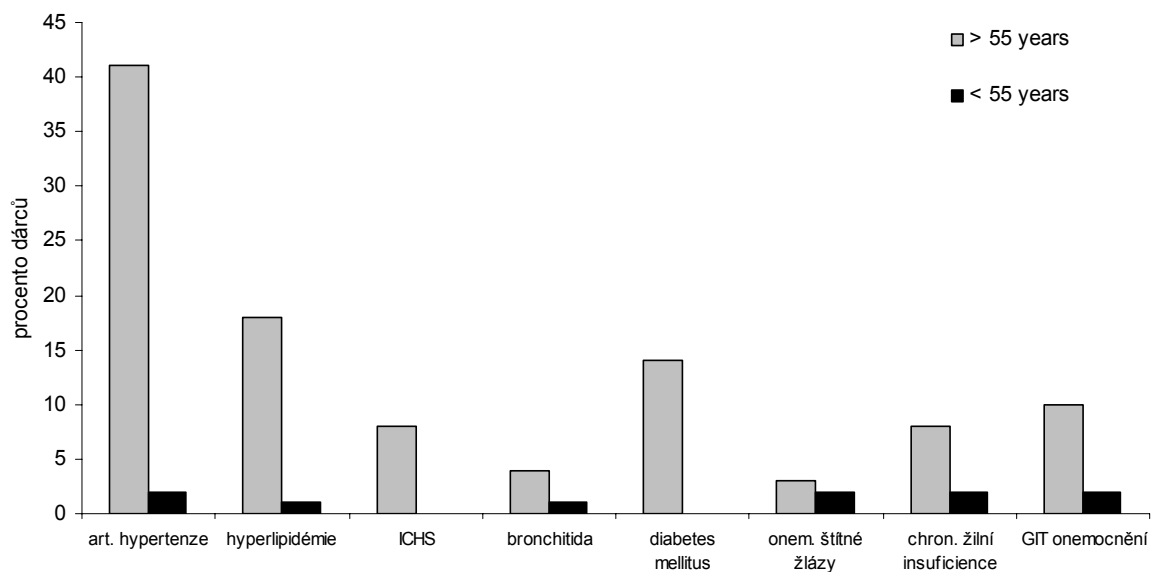
Graf 1. Počet chemoterapií FLU+CPA u pacientů s CLL před mobilizací

Předchozí chemoterapie mohou být jedním z faktorů limitujících úspěšnou mobilizaci zejména u preparátů s významnou „stem cell toxicitou“ jako je fludarabin. Medián předchozích chemoterapií s fludarabinem 4 cykly. FLU = fludarabin, CPA = cyklofosfamid



Graf 2. Frekvence komorbidit v souboru zdravých dárců

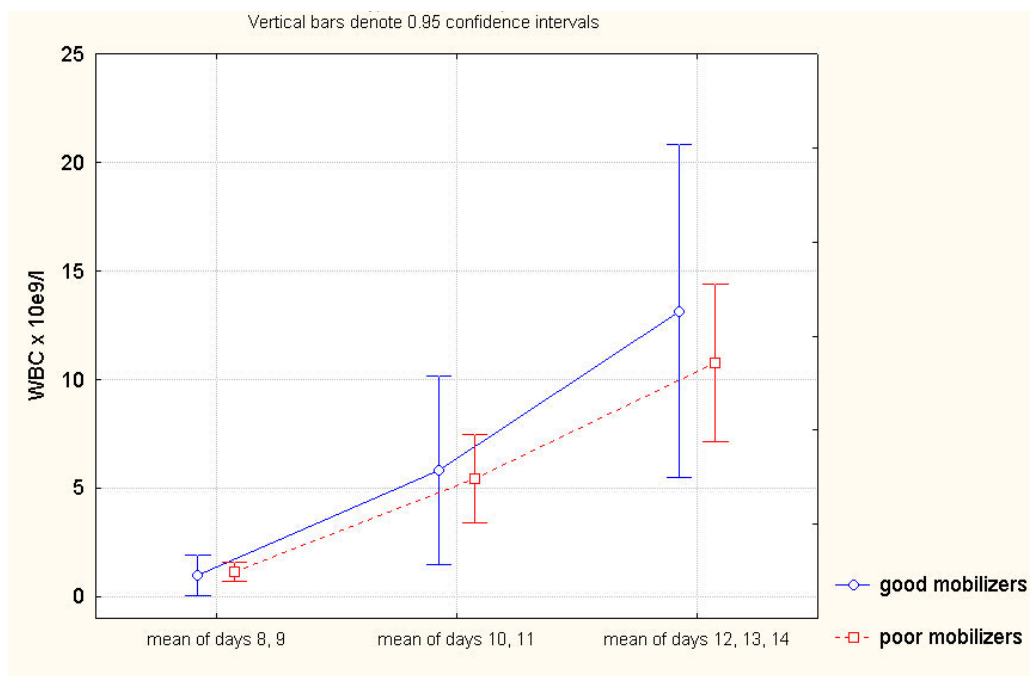
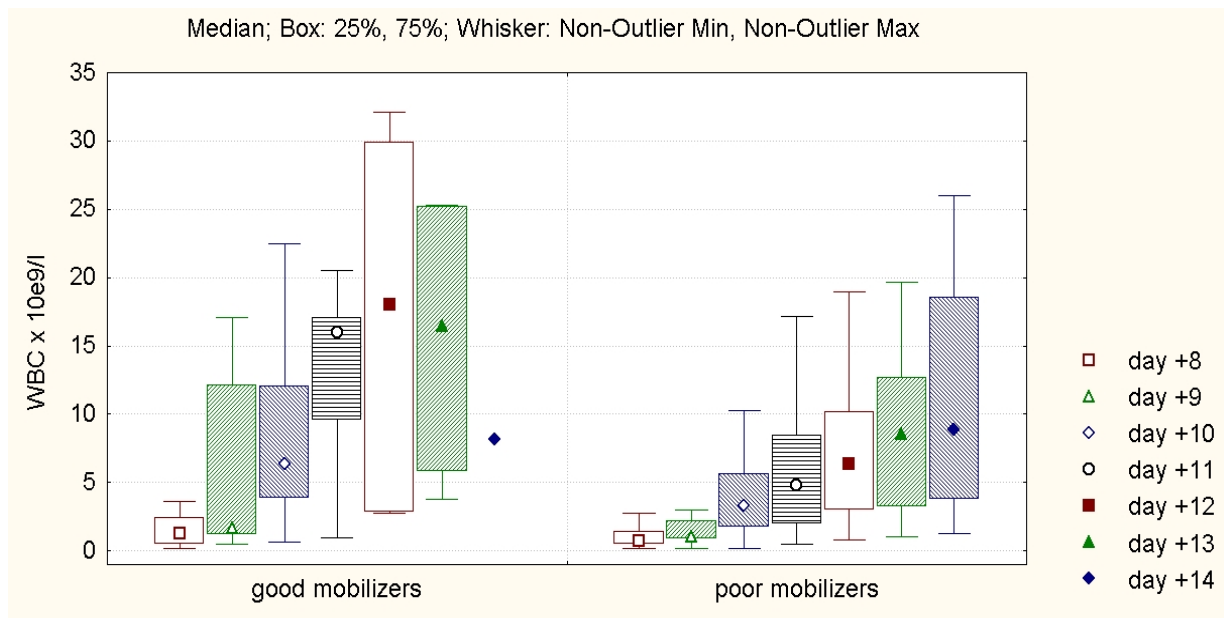
Frekvence komorbidit byla vyšší mezi staršími dárci (54 %) ve srovnání s mladšími (6 %), $p < 0.0001$. Hodnoceno dle Charlson Comorbidity Indexu. *Fischerův exaktní test*.



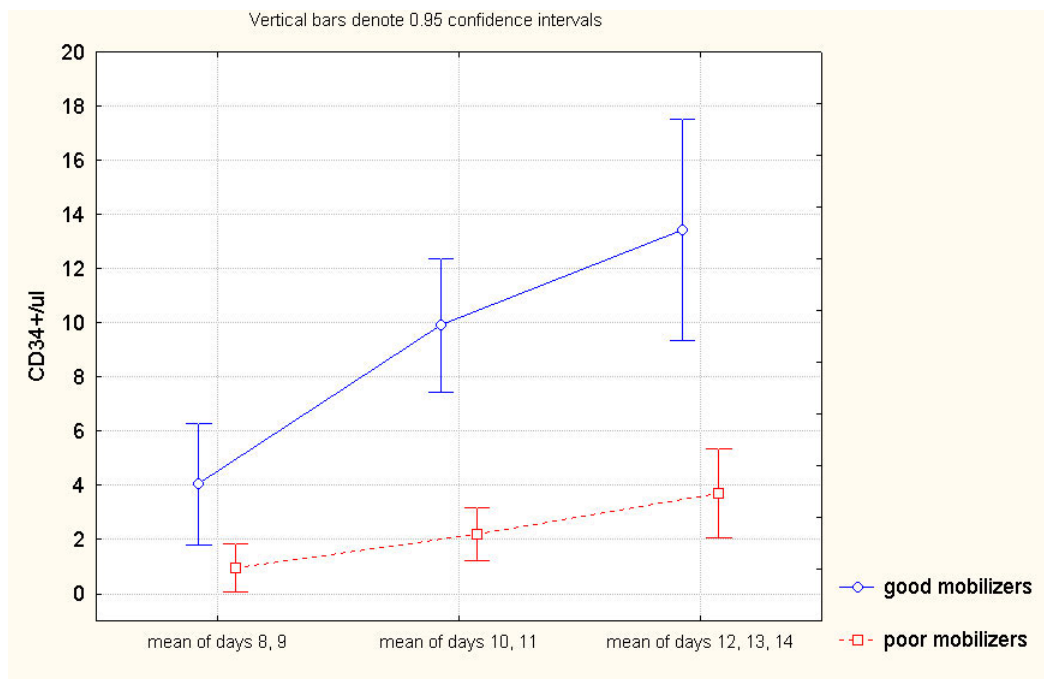
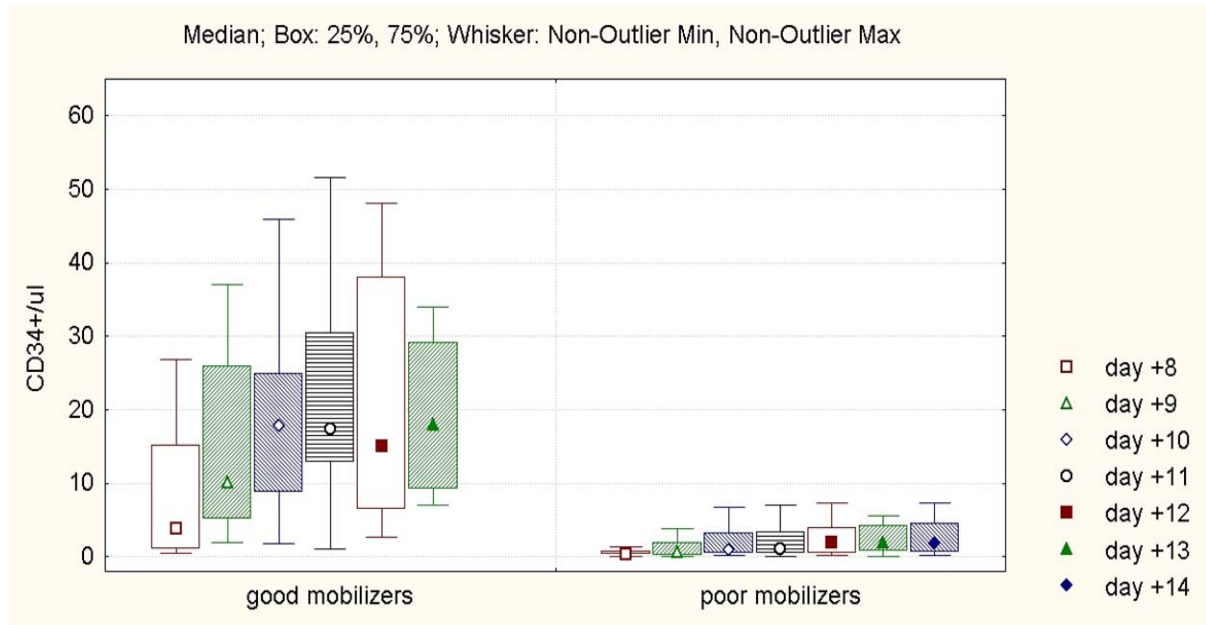
Graf 3a. + 3b. Kinetika leukocytů při mobilizaci pacientů s CLL

Podobná kinetika leukocytů u úspěšně mobilizovaných CLL pacientů a u non-responderů.

Multiple Box diagram a Whisker diagram (p=0.6909, parametrická repeated ANOVA).

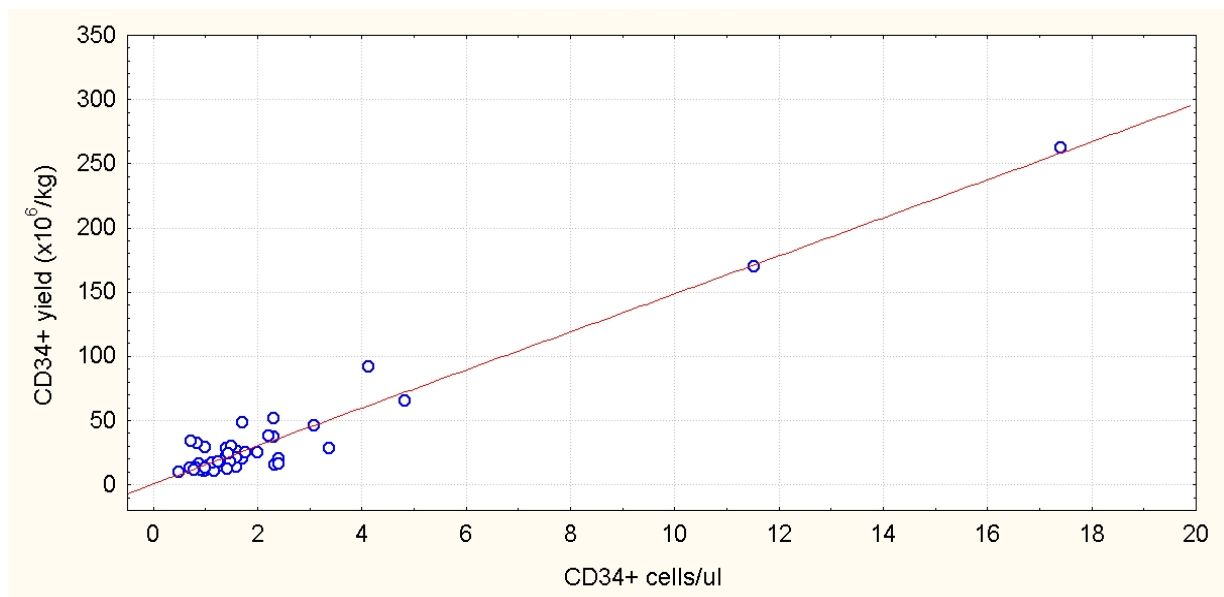


Graf 4a. + 4b. Kinetika CD34+ buněk v periferní krvi při mobilizaci pacientů s CLL
 Odlišná kinetika CD34+ buněk u úspěšně mobilizovaných CLL pacientů a u non-responderů. *Multiple Box diagram a Whisker diagram (p<0.0001, parametrická repeated ANOVA).*



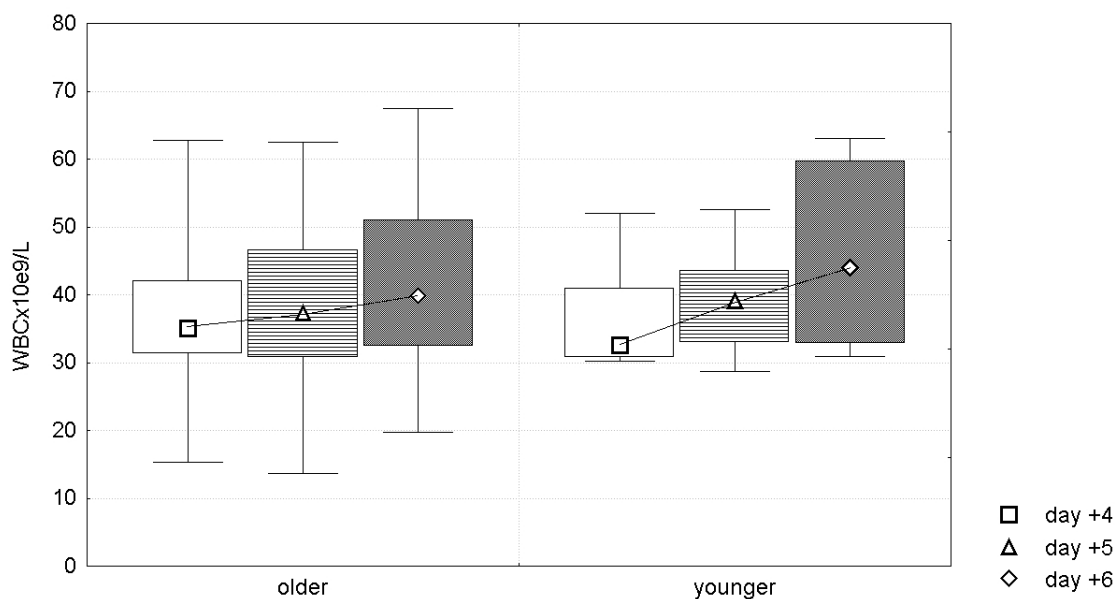
Graf 5. Vztah mezi množstvím CD34+ buněk v periferní krvi a aferézním produktem (CLL pacienti)

Mezi hladinou cirkulujících CD34+ buněk v periferní krvi před aferezou a výtěžkem CD34+ buněk/kg hmotnosti pacienta v aferézním produktu existuje silná korelace ($p < 0.0001$, $r_s = 0.6509$). Spearmanova pořadová korelace.



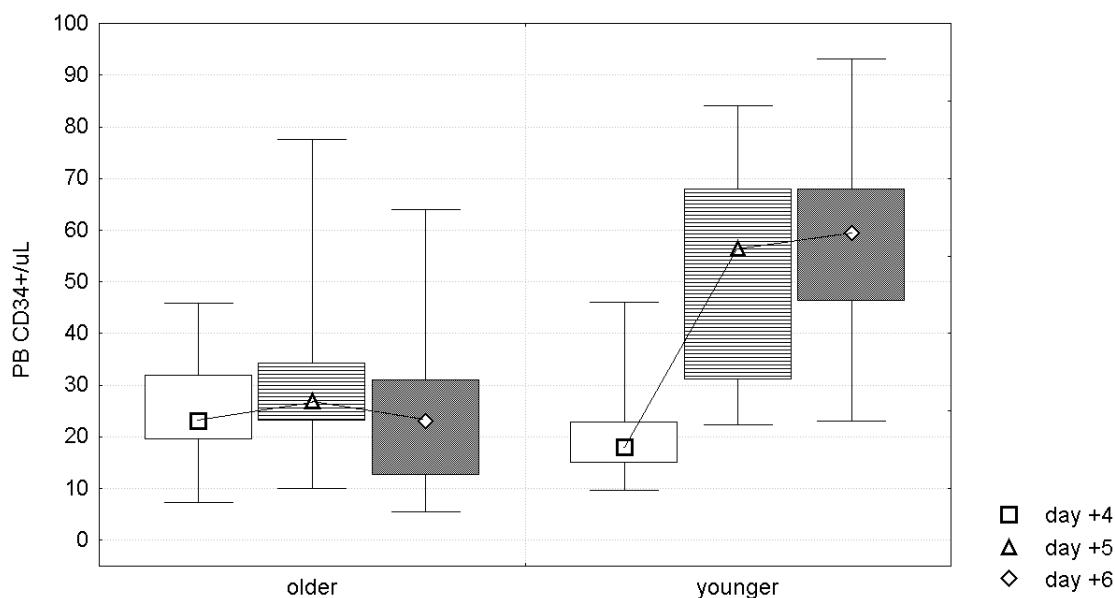
Graf 6. Vývoj hladin leukocytů v průběhu mobilizace zdravých dárců

Kinetika leukocytů byla stejná ve skupině starších i mladších dárců s maximem v den +5 (medián 43.2 x 10⁹/l vs. 41.7 x 10⁹/l, ns.). *Neparametrický mediánový test, multiple Box&Whisker diagram.*



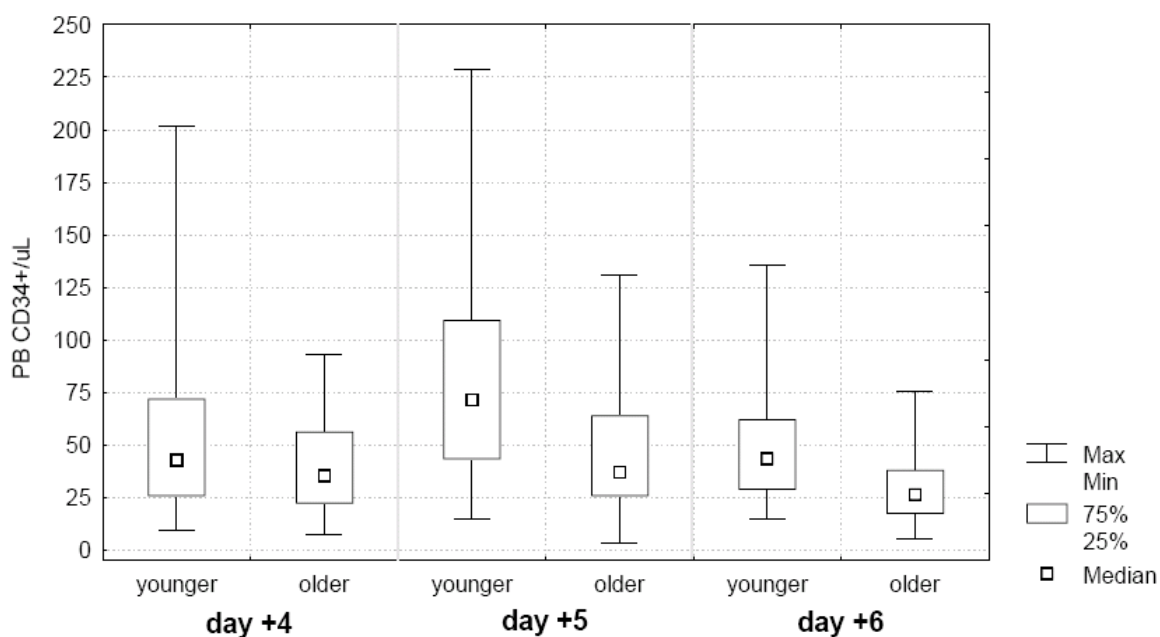
Graf 7. Vývoj hladin CD34+ buněk v průběhu mobilizace zdravých dárců

CD34+ buňky vykazovaly statisticky signifikantní vzestup mezi dny +4 a +5 u mladších ($p < 0.0001$) i u starších dárců ($p = 0.0086$), ovšem absolutní hodnoty byly u mladších dárců vyšší – viz. graf 8. a 9. *Znaménkový párový test, multiple Box&Whisker diagram.*



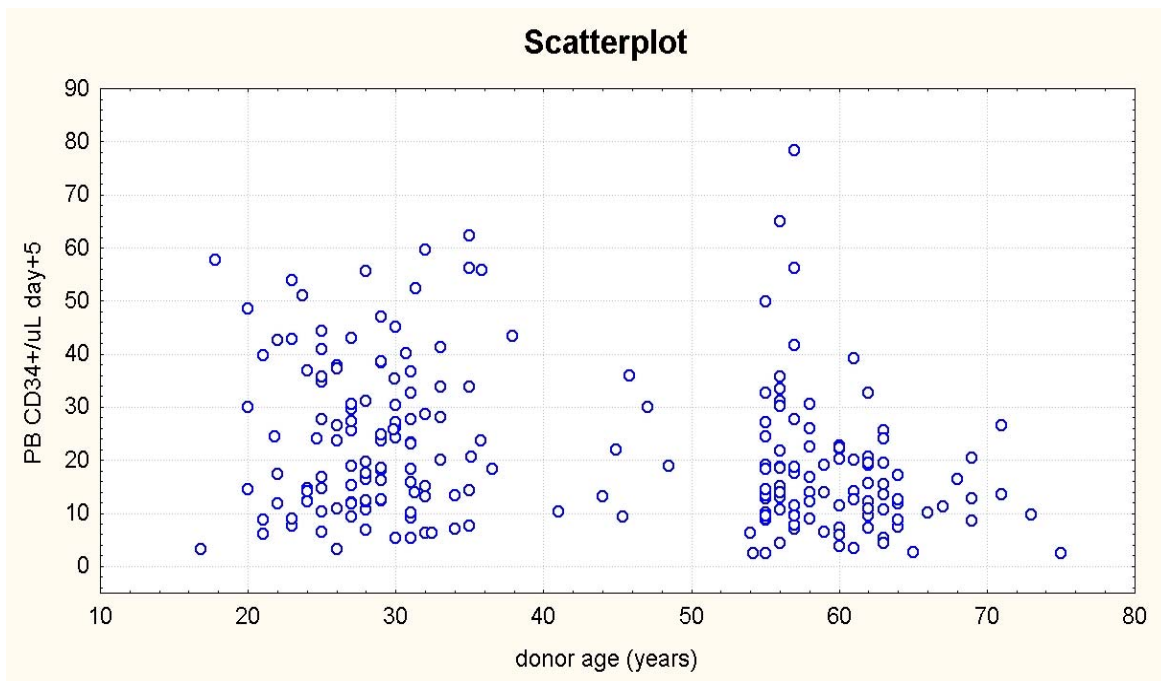
Graf 8. Rozdíly hladin cirkulujících CD34+ buněk mezi staršími a mladšími dárci

Absolutní hodnota CD34+ buněk v den +5 byla u mladých dárců téměř dvojnásobná ve srovnání se staršími (72.0 vs. 37.0 buněk/ μ l, $p < 0.0001$). *Neparametrický mediánový test.*



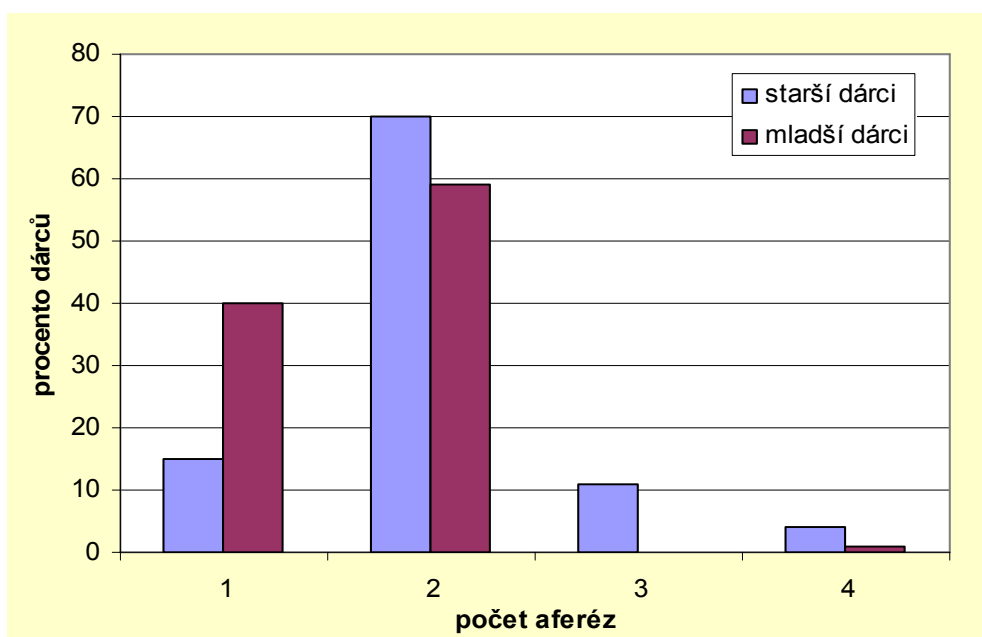
Graf 9. Závislost množství vyplavených CD34+ buněk na věku zdravého dárce

Lineární regrese prokázala silnou korelaci mezi věkem dárce a hladinou CD34+ buněk v periferní krvi v den +5 ($p < 0.0001$, $r_s = -0.40$, Spearmanova pořadová korelace). *Scatter diagram.*



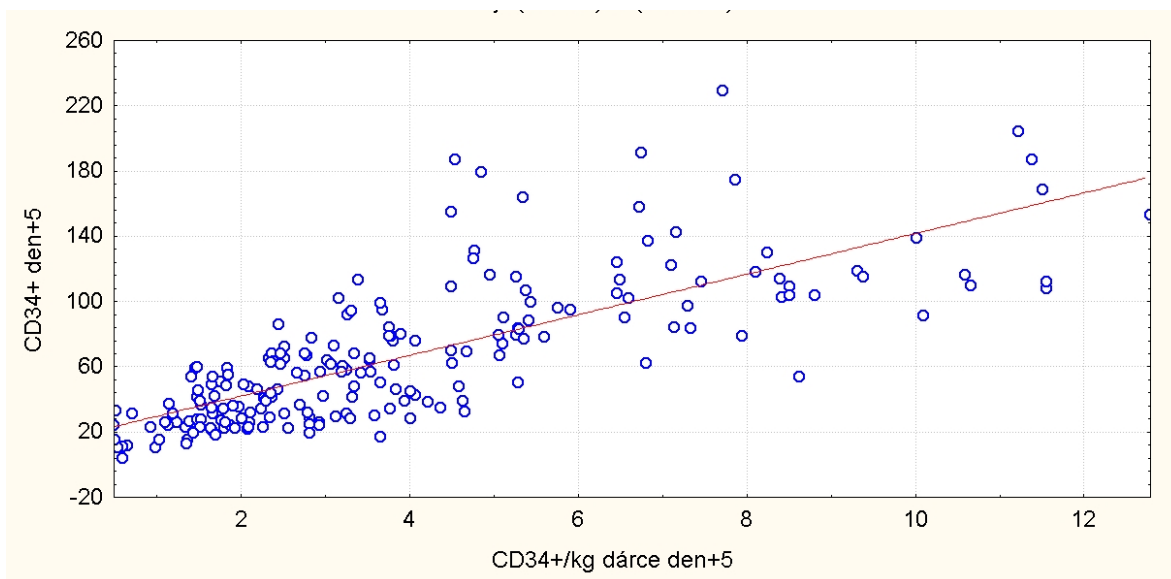
Graf 10. Počet aferez nezbytný k získání požadovaného transplantátu u zdravých dárců

Ve skupině starších dárců bylo častěji nutné provádět více než 1 aferezu k získání požadované dávky CD34+ buněk $\geq 4 \times 10^6/\text{kg}$ hmotnosti příjemce (85 % vs. 60 %).



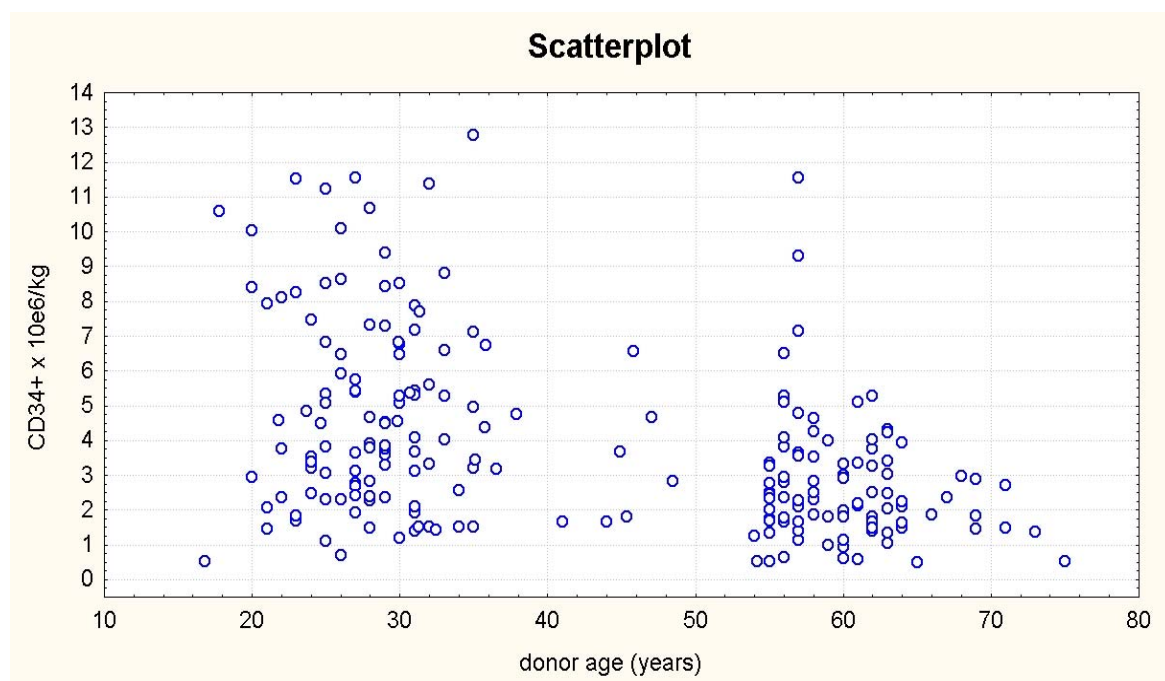
Graf 11. Vztah mezi množstvím CD34+ buněk v periferní krvi a ferézním produktu (zdraví dárce)

Obsah CD34+ buněk v transplantátu koreluje s hladinou CD34+ buněk v periferní krvi před aferezou ($p < 0.0001$). Spearmanova pořadová korelace.

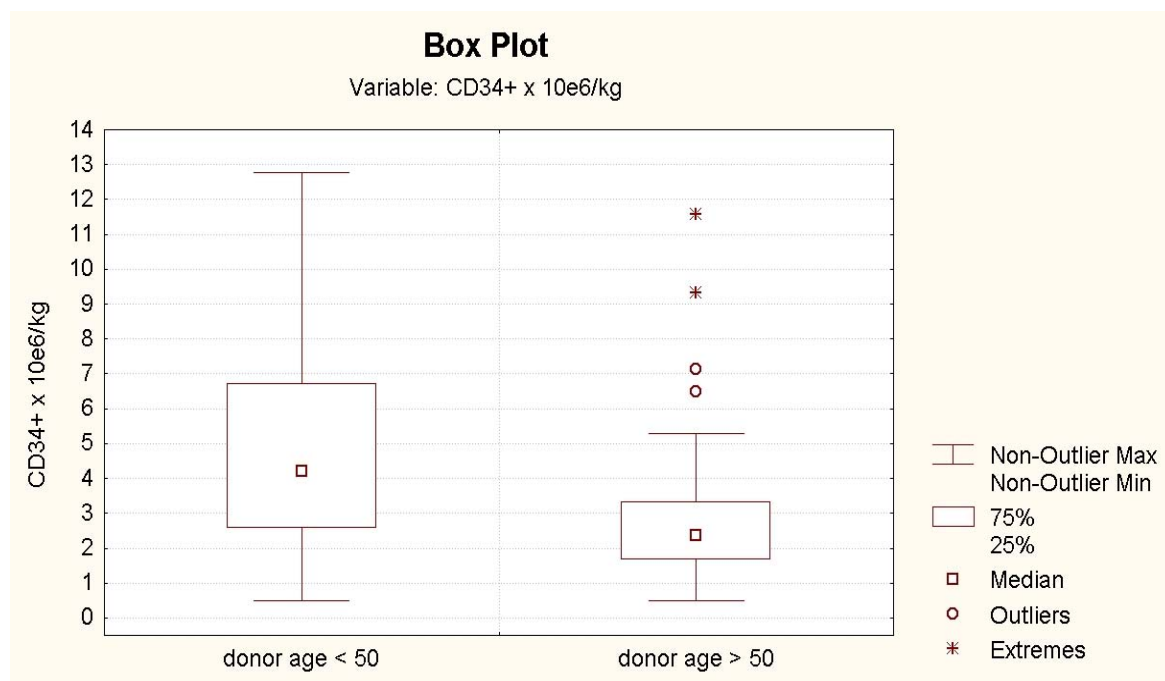


Graf 12a. + 12b. Závislost množství odebraných CD34+ buněk na věku zdravého dárce

Lineární regrese prokázala vliv věku dárce na odebrané množství CD34+ buněk/kg hmotnosti dárce ($p < 0.0001$, $r_s = -0.39$, Spearmanova pořadová korelace). *Scatter diagram*.

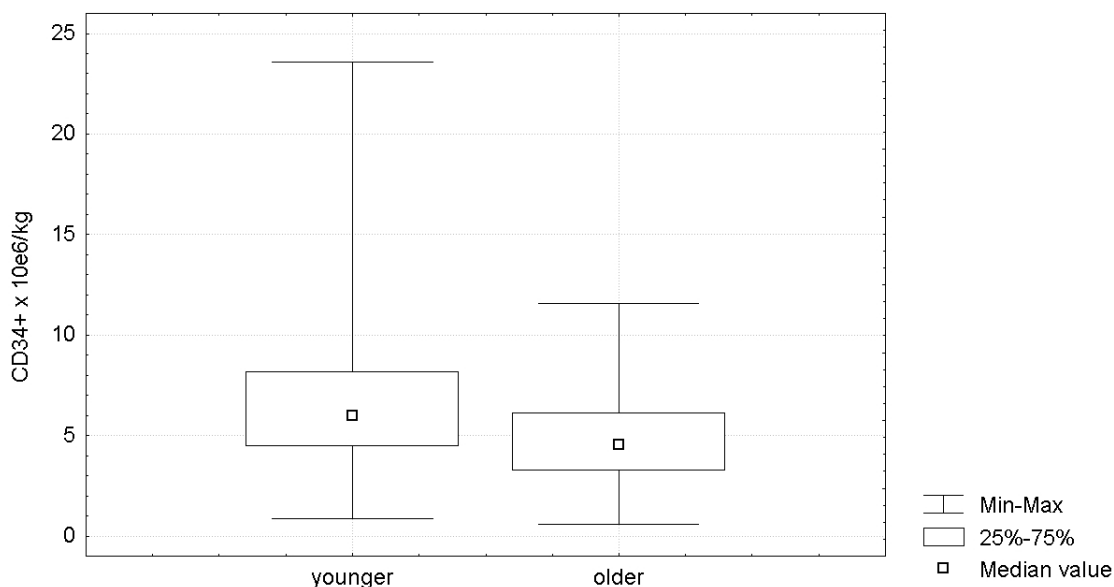


Množství odebraných CD34+ buněk/kg hmotnosti dárce v den +5 bylo vyšší ve skupině dárců <50 let ve srovnání se skupinou ≥ 50 let: 4.22 vs. $2.37 \times 10^6/\text{kg}$ (mediány, $p < 0.0001$, neparametrický mediánový test). *Box diagram*.



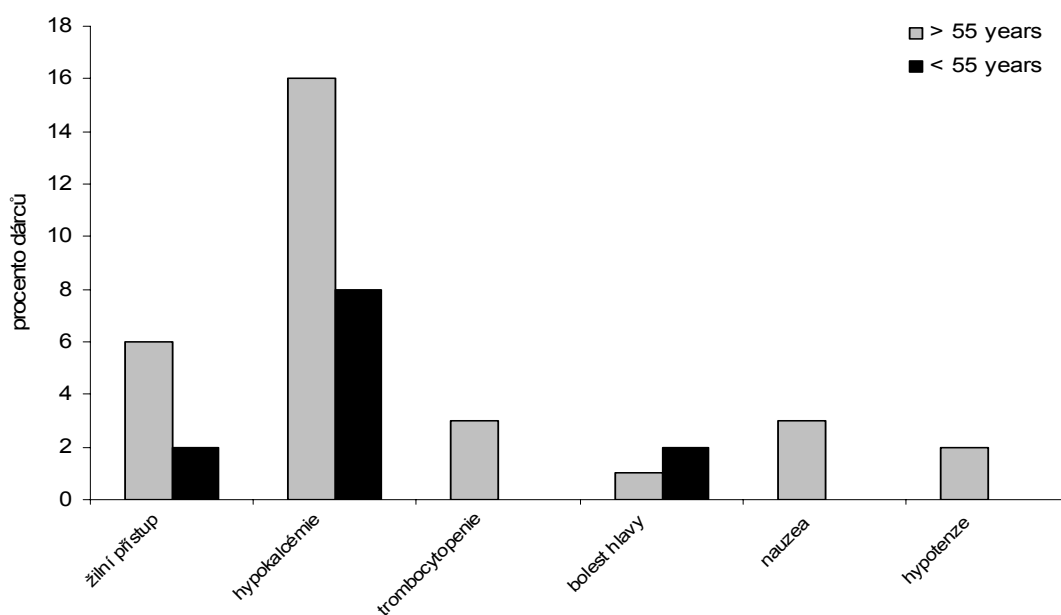
Graf 13. Porovnání celkového odebraného množství CD34+ buněk mezi staršími a mladšími dárci

Celkové množství CD34+ buněk/kg hmotnosti příjemce získané z celé aferetické série bylo nižší u starších dárců: $5.26 \times 10^6/\text{kg}$ (0.45 – 15.12) vs. $7.66 \times 10^6/\text{kg}$ (1.18 – 32.67), $p=0.0021$. *Neparametrický mediánový test.*



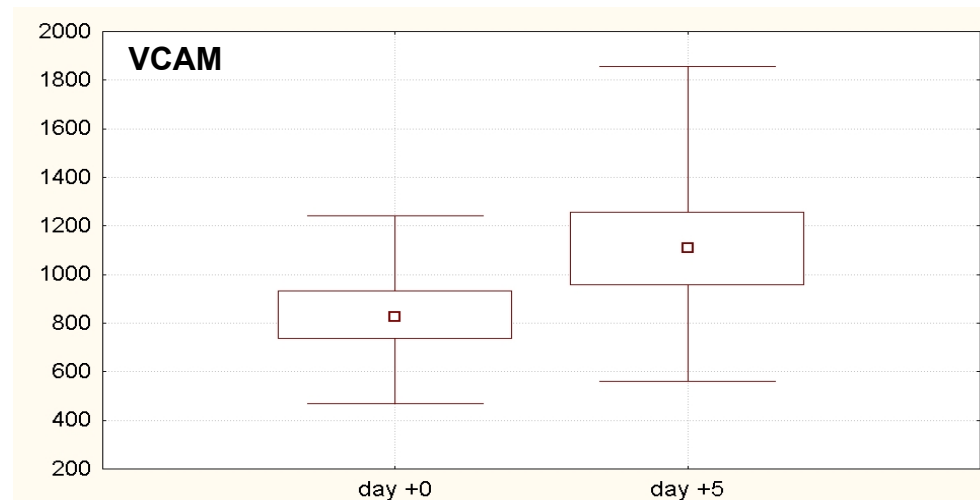
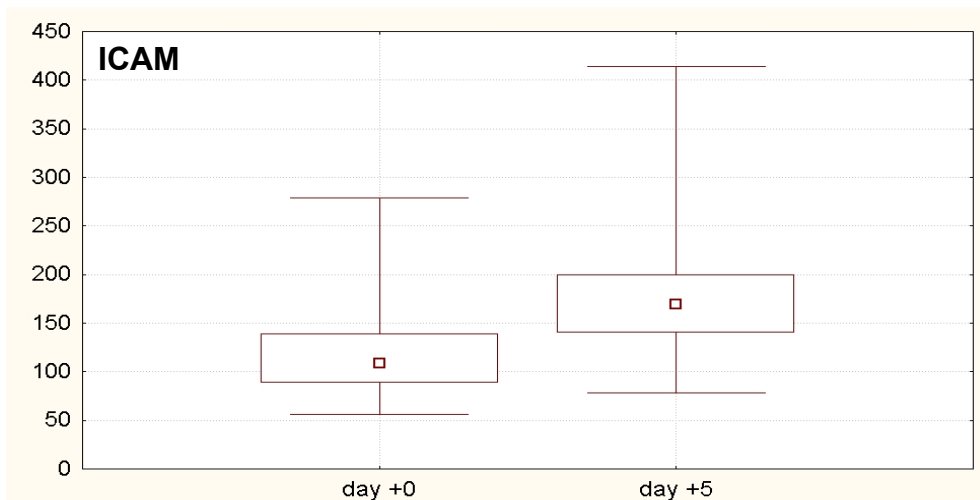
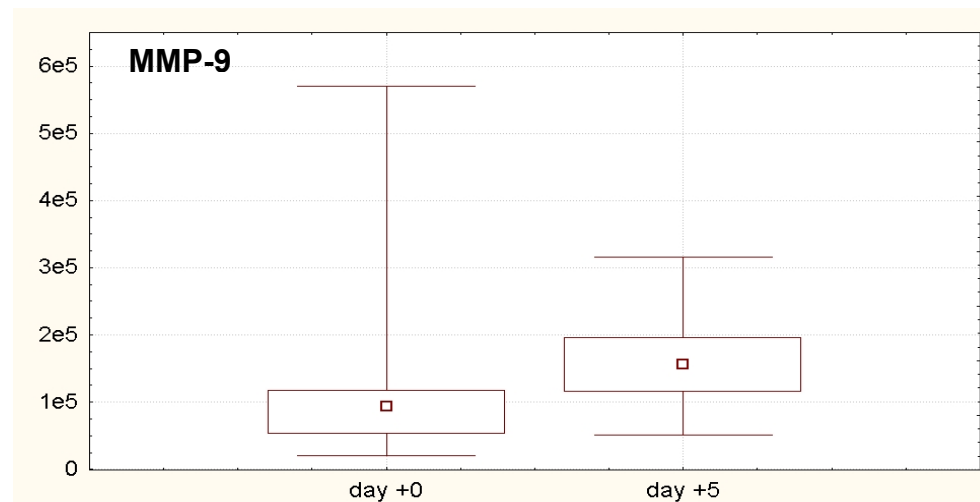
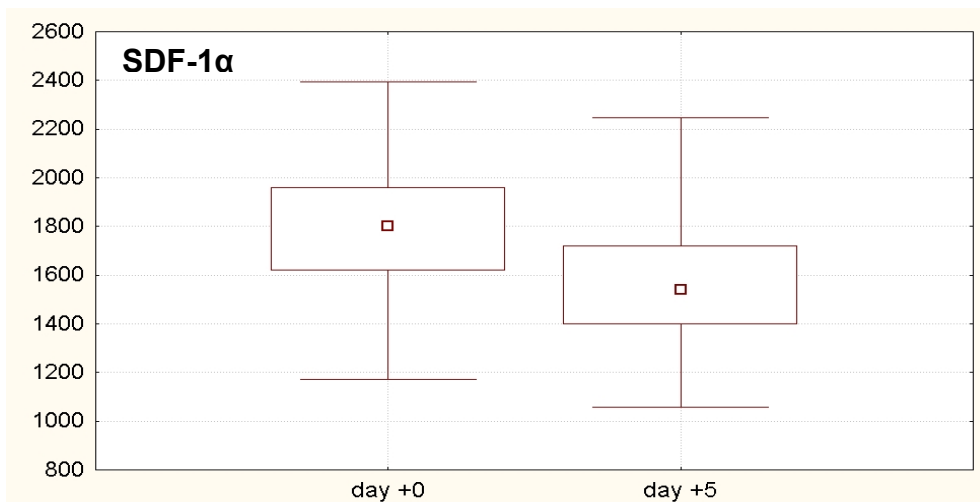
Graf 14. Komplikace aferézy u zdravých dárců

Nežádoucí reakce spojené s aferézou byly častější u starších dárců (29 % versus 15 %, $p=0.0208$). *Chi-kvadrát test.*



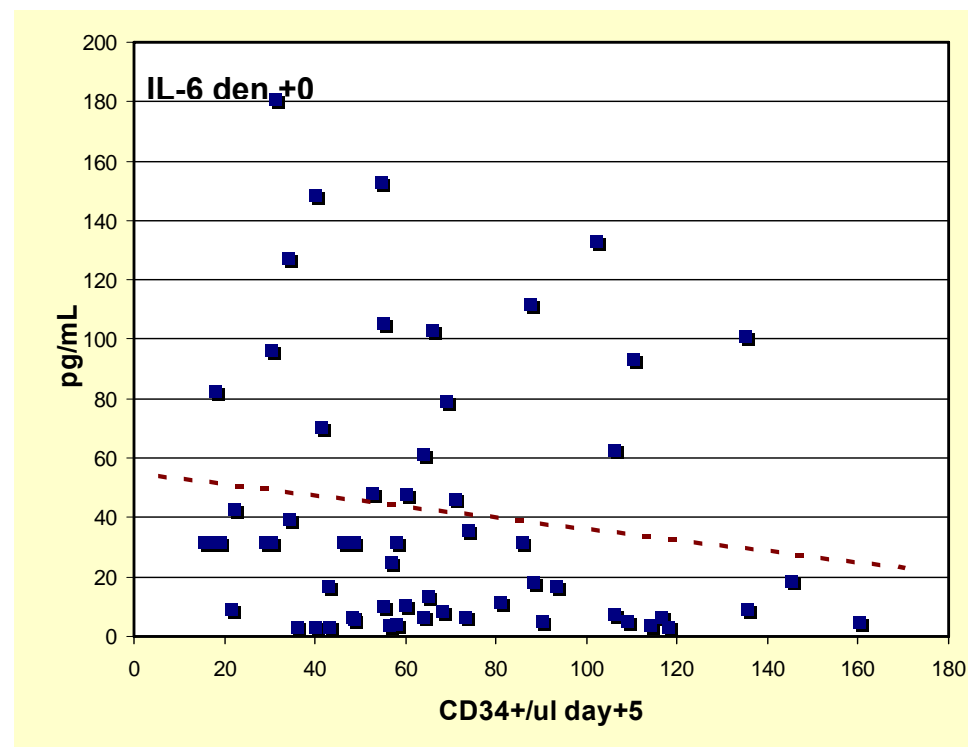
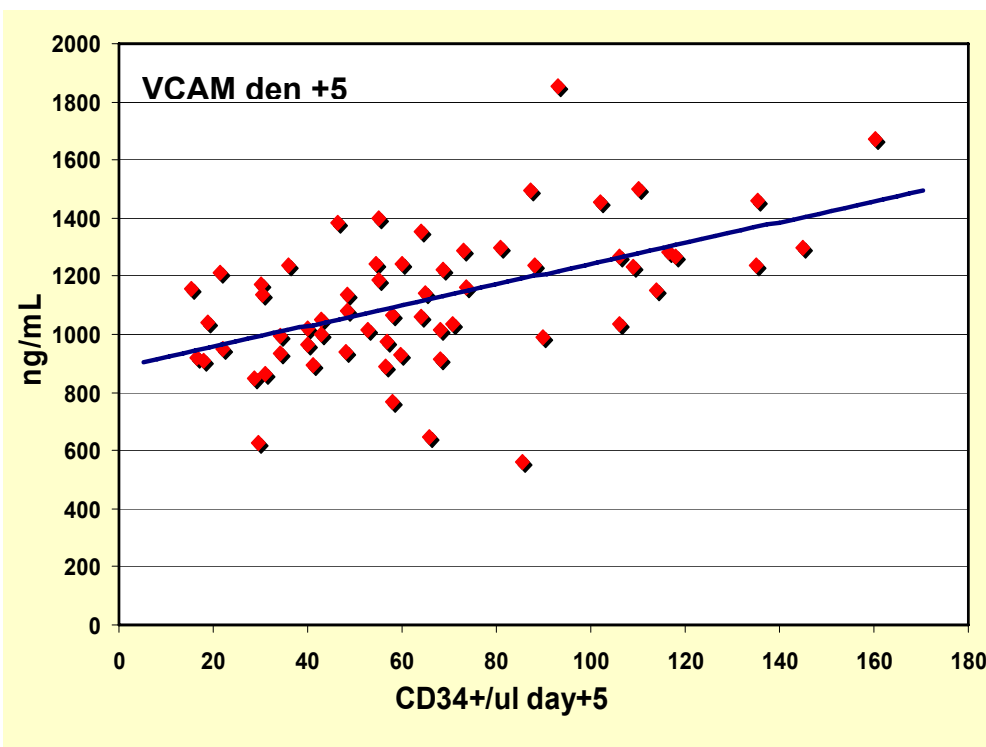
Graf 15a. – 15d. Změna hladiny cytokinů po stimulaci G-CSF u zdravých dárců

Vlivem stimulace G-CSF hladiny některých cytokinů stoupají – např.: ICAM ($p < 0.0001$), VCAM ($p < 0.0001$), MMP-9 ($p = 0.0039$), hladiny jiných klesají – např.: SDF-1 α ($p = 0.0002$). *Párový znaménkový test.*



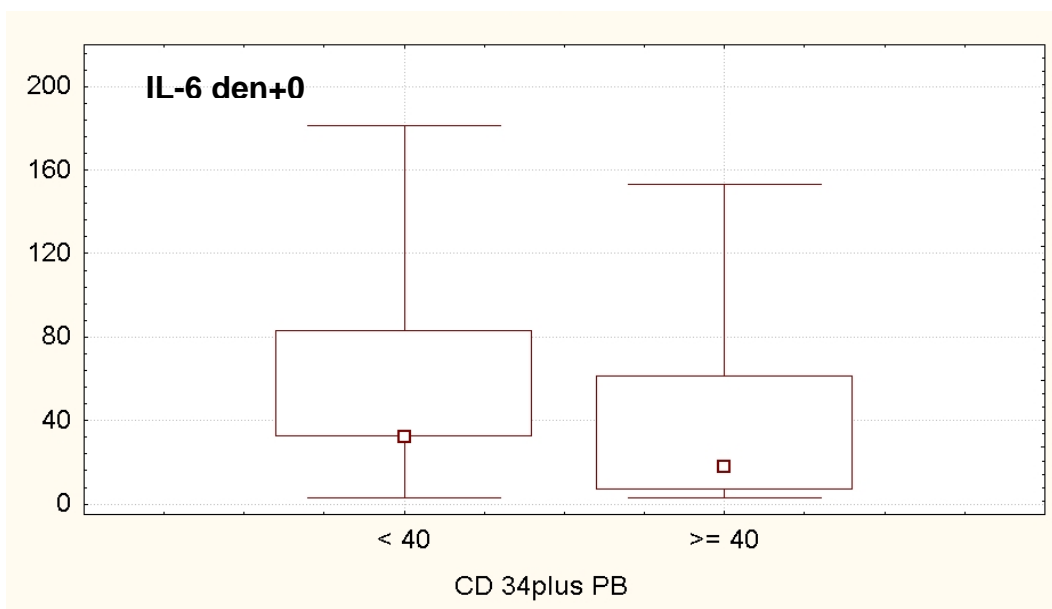
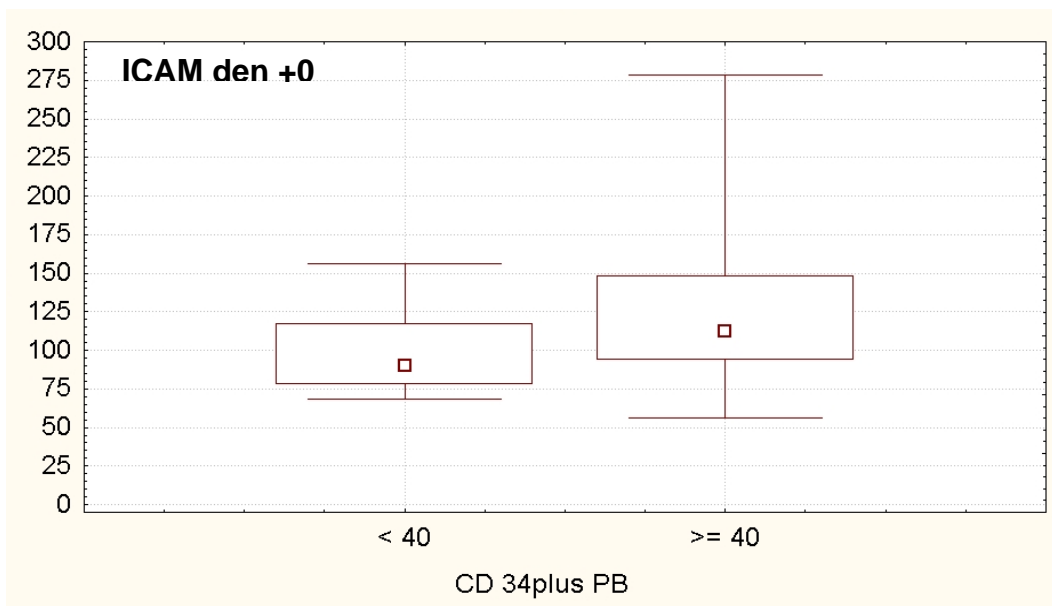
Graf 16a. – 16b. Korelace mezi hladinou CD34+ buněk v den +5 a hladinou některých cytokinů v den +0 resp. den +5

Byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou CD34+ buněk v periferní krvi dárce v den +5 a hladinami VCAM ($p < 0.0001$, $r_s = 0.55$) v den +5 a zároveň hraniční negativní korelace s hladinou IL-6 v den +0, tedy před stimulací ($p = 0.0861$, $r_s = -0.23$). *Spearmanova pořadová korelace.*



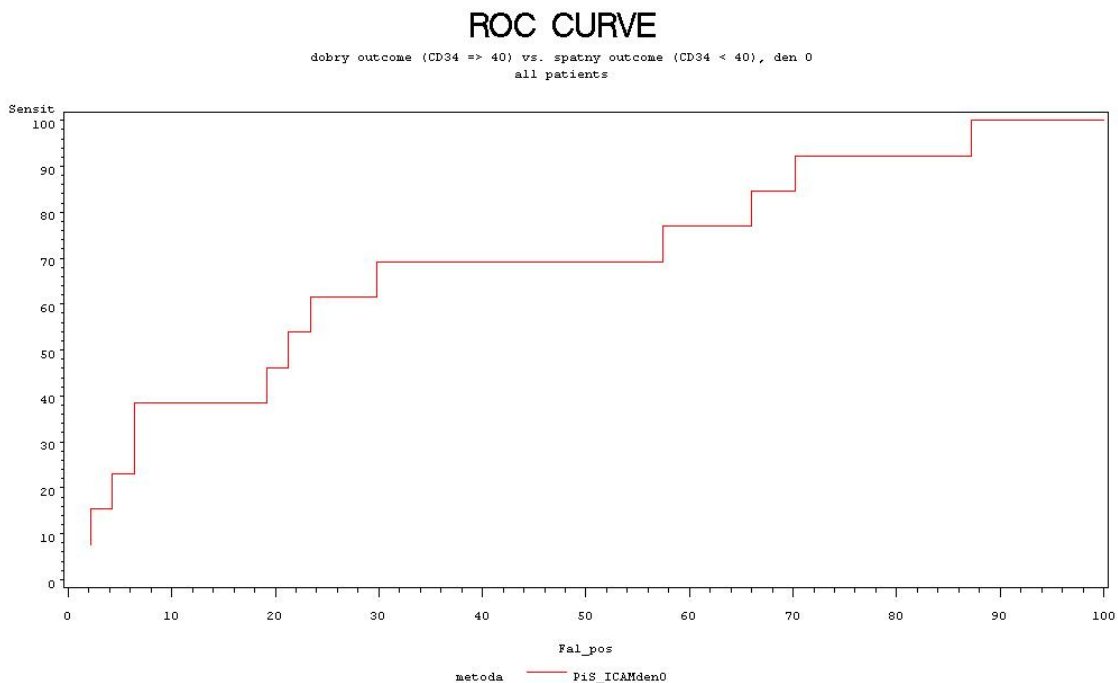
Graf 17a. – 17b. Rozdíly hladin ICAM a IL-6 mezi špatně a dobře mobilizovatelnými dárci

Mezi špatně a dobře mobilizovatelnými dárci (cut- off 40.0 CD34+ buněk/ μ l v den +5) byly nalezeny rozdíly v hladinách ICAM v den +0 ($p=0.0369$) a hraničně také IL-6 ($p=0.0776$) v den +0 (před stimulací). *Wilcoxonův test*.



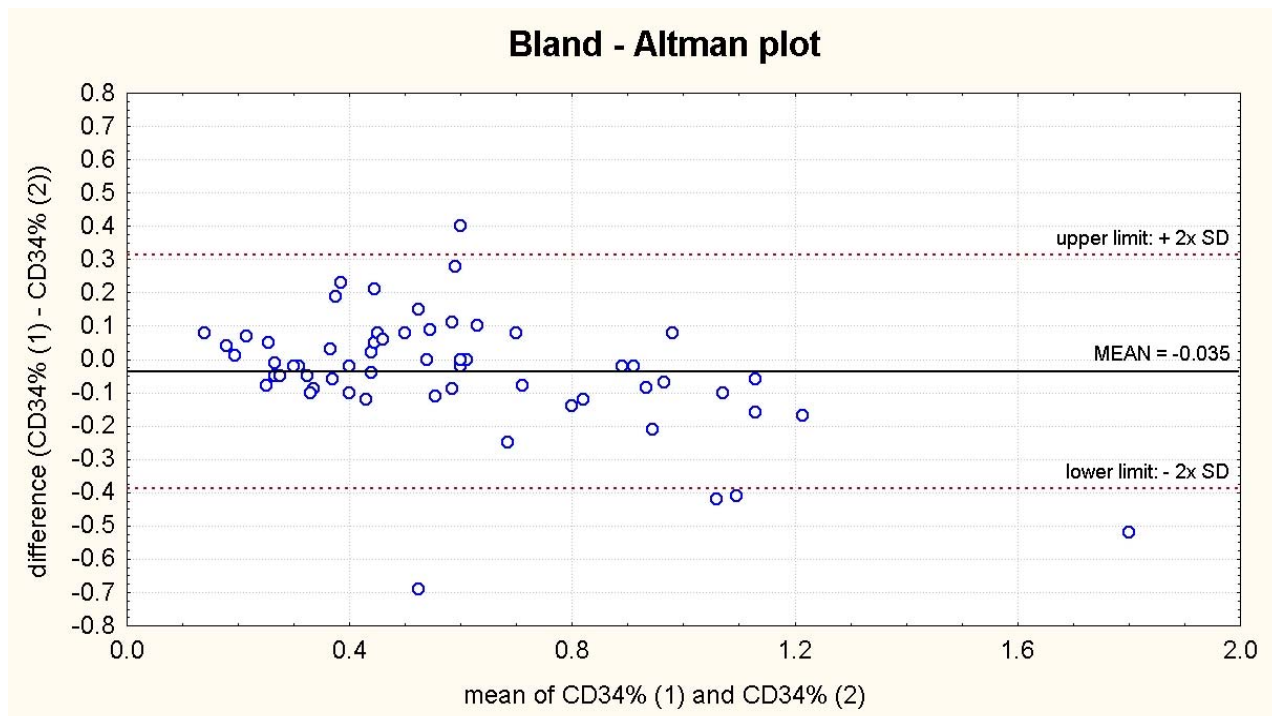
Graf 18. Hladina ICAM v den +0 jako predikátor výsledku mobilizace

Pomocí ROC křivky byla testována sensitivita (69 %) a specifita (70 %) sICAM-1 jako prediktivního faktoru výsledku mobilizace při cut-off 100 ng/ml.

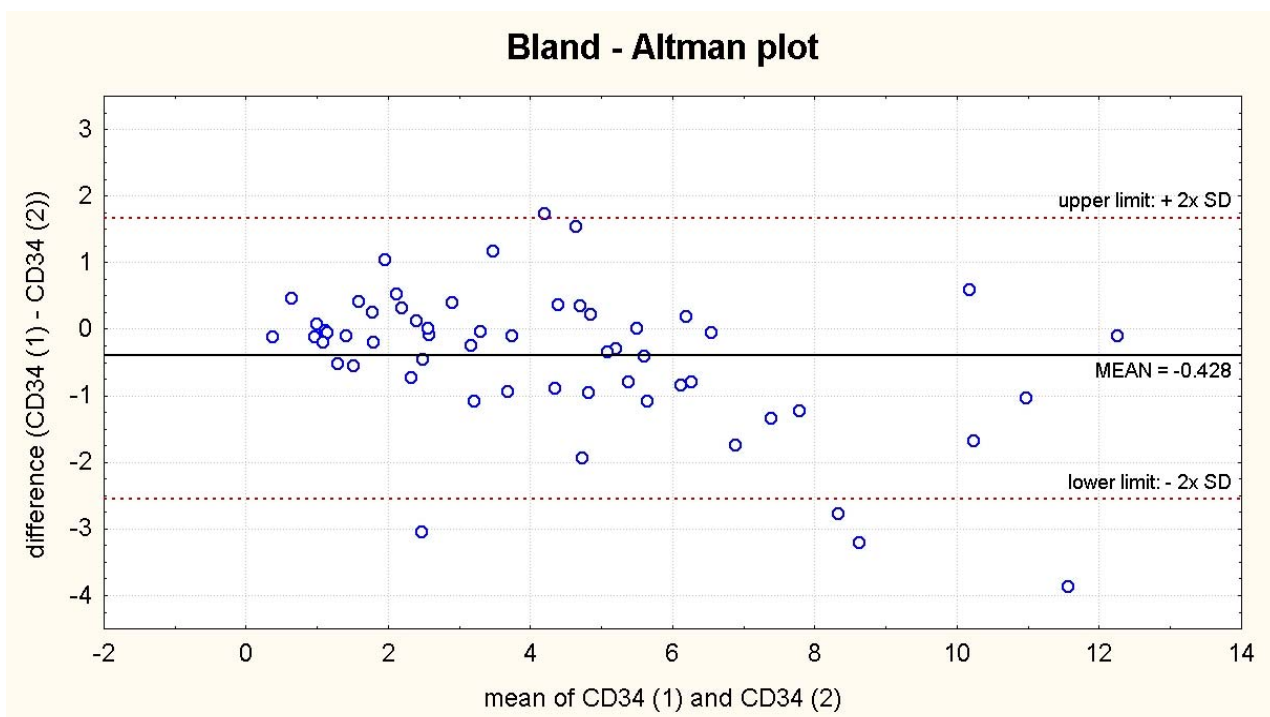


Graf 19a. – 19b. Porovnání kvantifikace CD34+ buněk mezi transplantačními centry na exportovaných/importovaných transplantátech.

Porovnání % zastoupení CD34+ buněk ($p < 0.0001$, $r_s = 0.8509$, Spearmanova pořadová korelace). *Bland-Altmanův graf.*

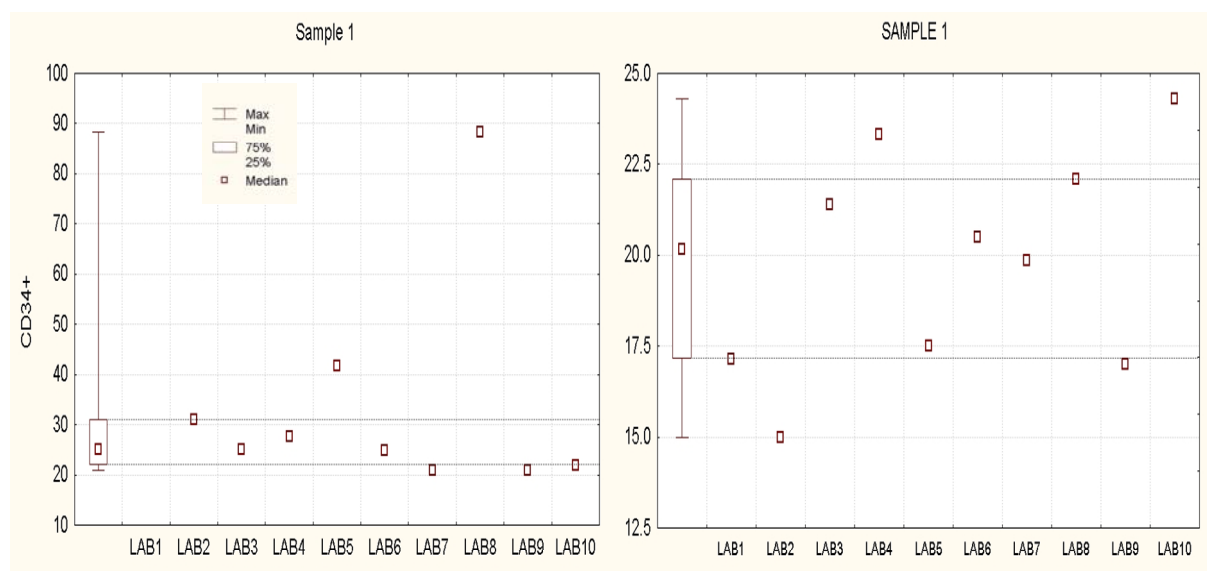
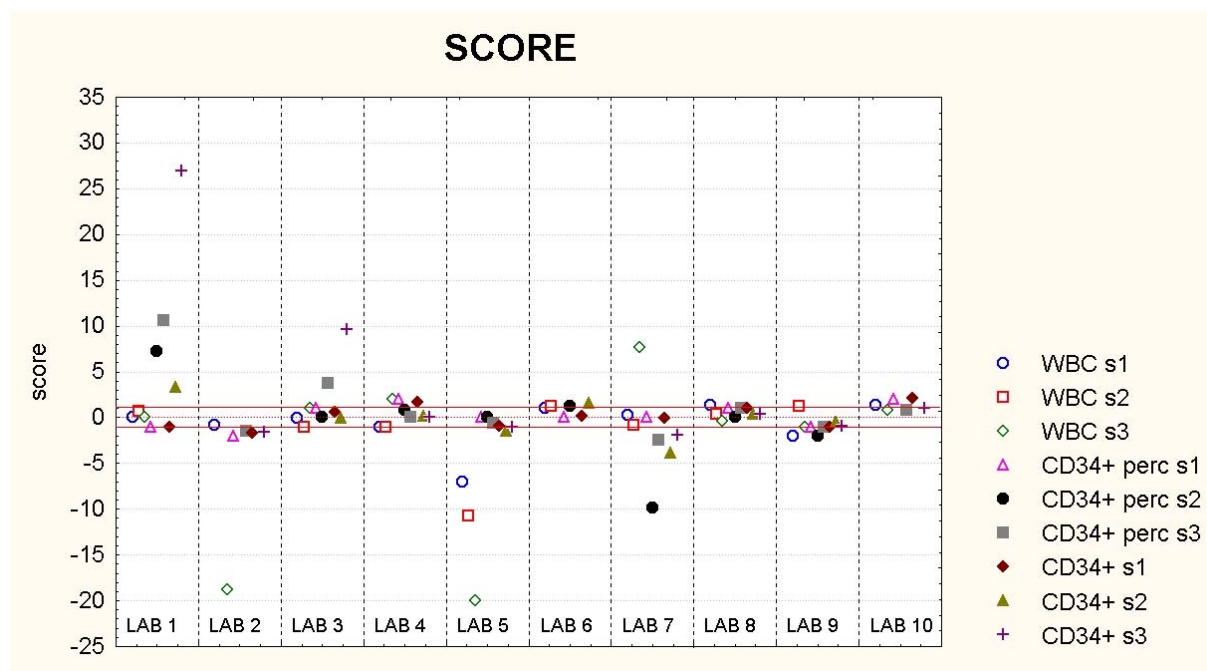


Porovnání absolutního počtu CD34+ buněk $\times 10^8$ ($p < 0.0001$, $r_s = 0.9434$, Spearmanova pořadová korelace). *Bland-Altmanův graf.*

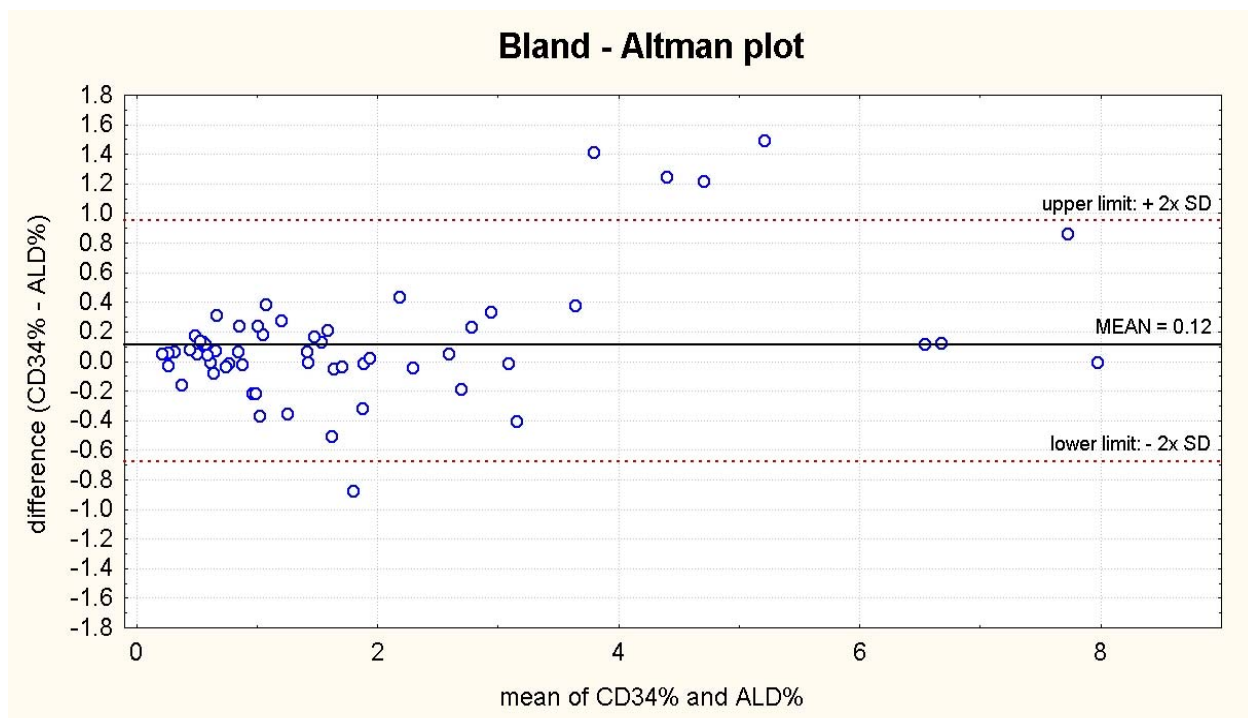


Graf 20a – 20b. Mezilaboratorní kontrola kvality stanovení CD34+ buněk.

Zařazeno celkem 10 laboratoří při transplantačních centrech v ČR. Organizováno HOO FN Plzeň. 20a.: Skóre jednotlivých laboratoří pro WBC, CD34+%, CD34+/μl v rámci jednoho kontrolního cyklu. 20b.: Snížení mezilaboratorní variability stanovení CD34+/μl mezi dvěma konsekutivními kontrolními cykly. *Výpočet skóre viz text.*

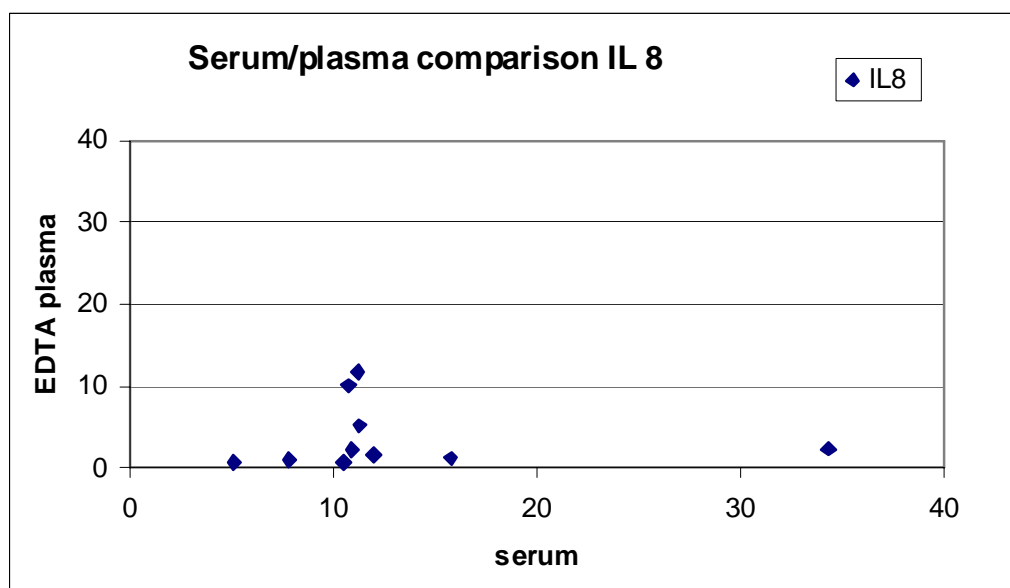


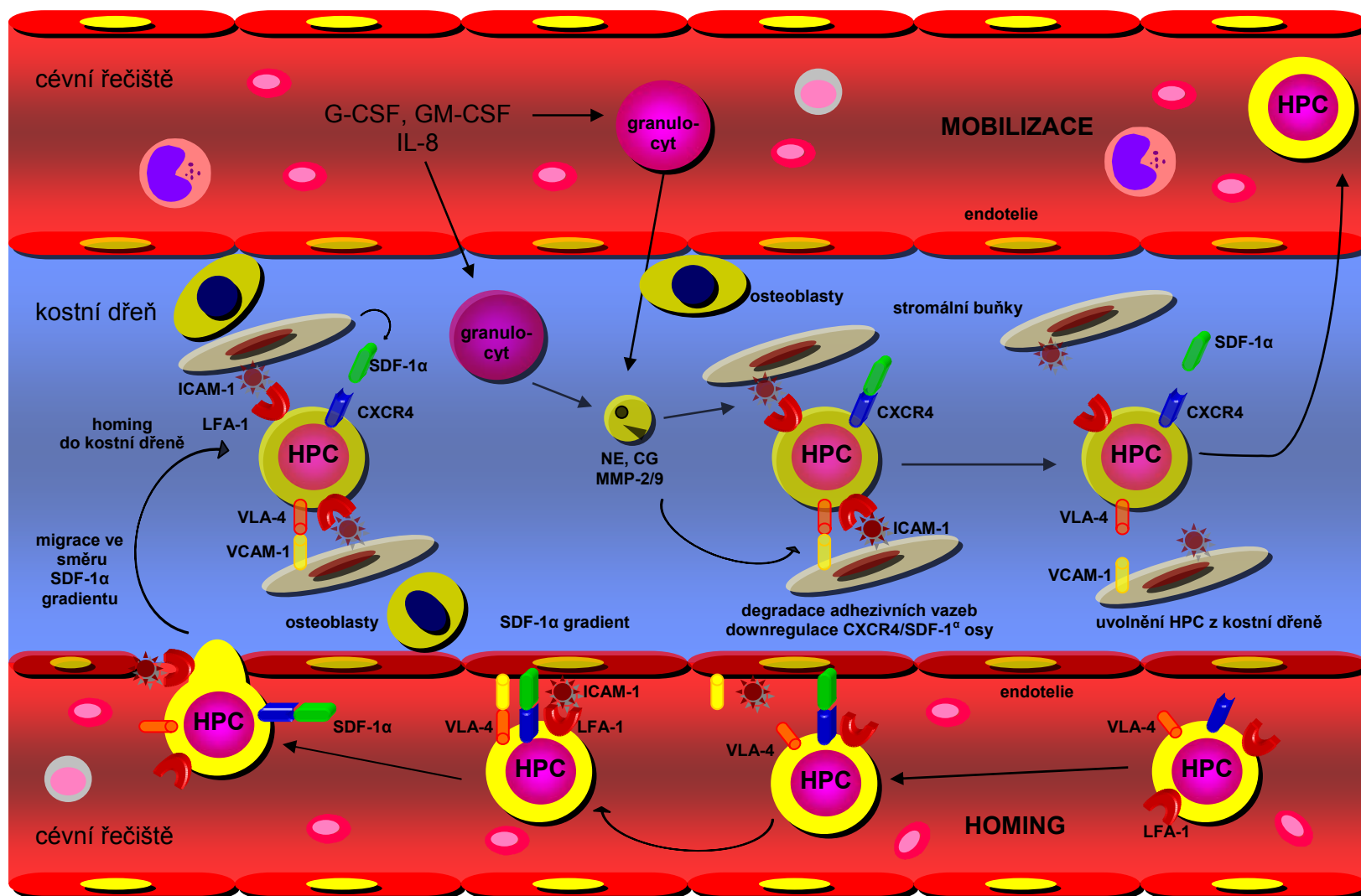
Graf 21. Porovnání kvantifikace hemopoetických progenitorových buněk. Immunofenotypizace CD34+ antigenu versus stanovení enzymatické aktivity aldehyddehydrogenazy ($p < 0.0001$, $r_s = 0.9765$, Spearmanova pořadová korelace). *Bland-Altmanův graf.*



Graf 22. Porovnání hladin IL-8 paralelně měřených v séru a v EDTA plazmě

Koncentrace některých analytů se mohou lišit v séru a plazmě. Hodnoty IL-8 v korelačním experimentu na pacientech s kolorektálním karcinomem byly v séru více než 7 x vyšší oproti plazmě (medián 11.03 vs 1.88 pg/ml), graf poskytla Mgr.Jindra Vrzalová.

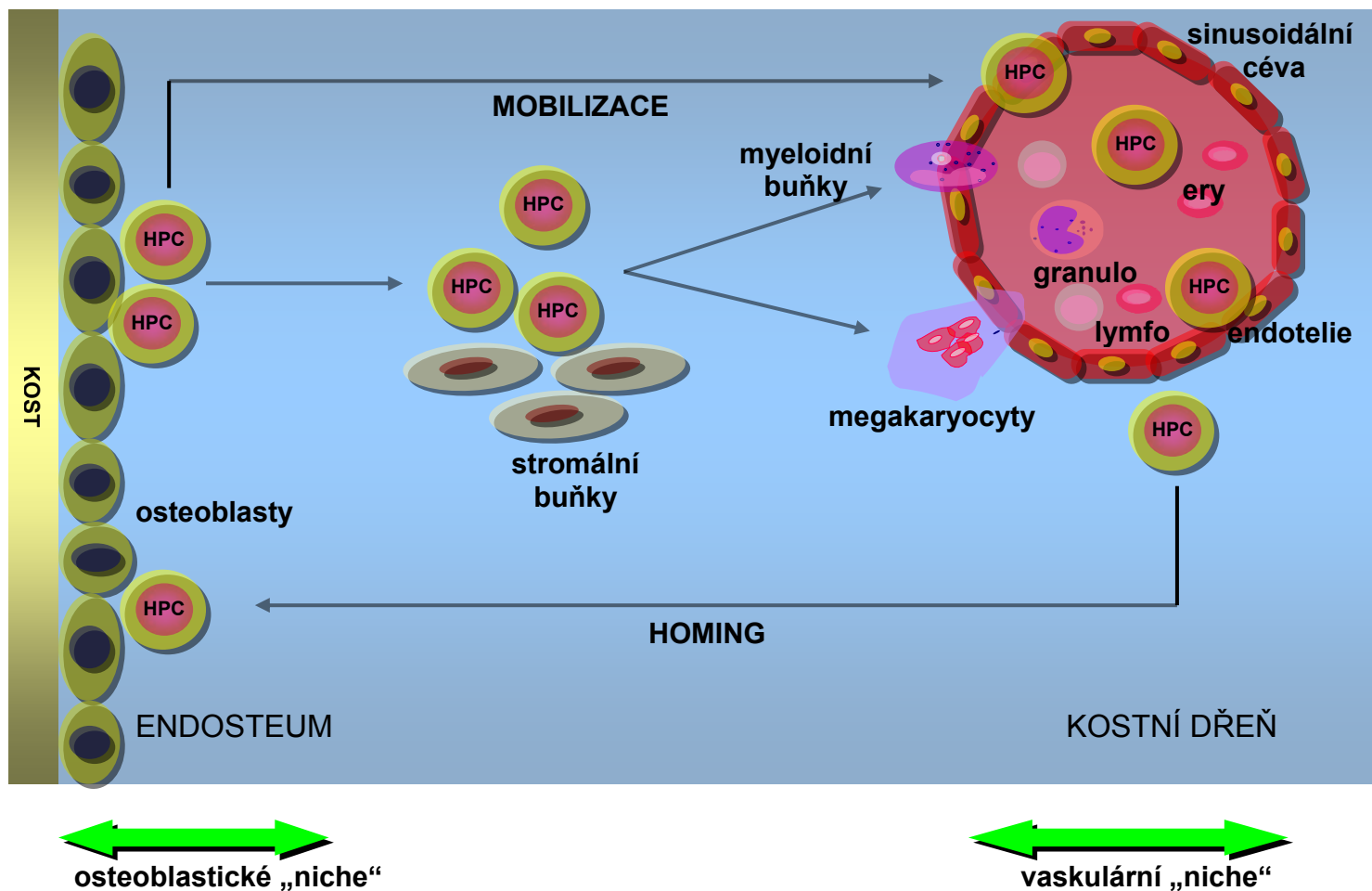




Obrázek 1. Homing a mobilizace hemopoetických progenitorových buněk do a z kostní dřeně.

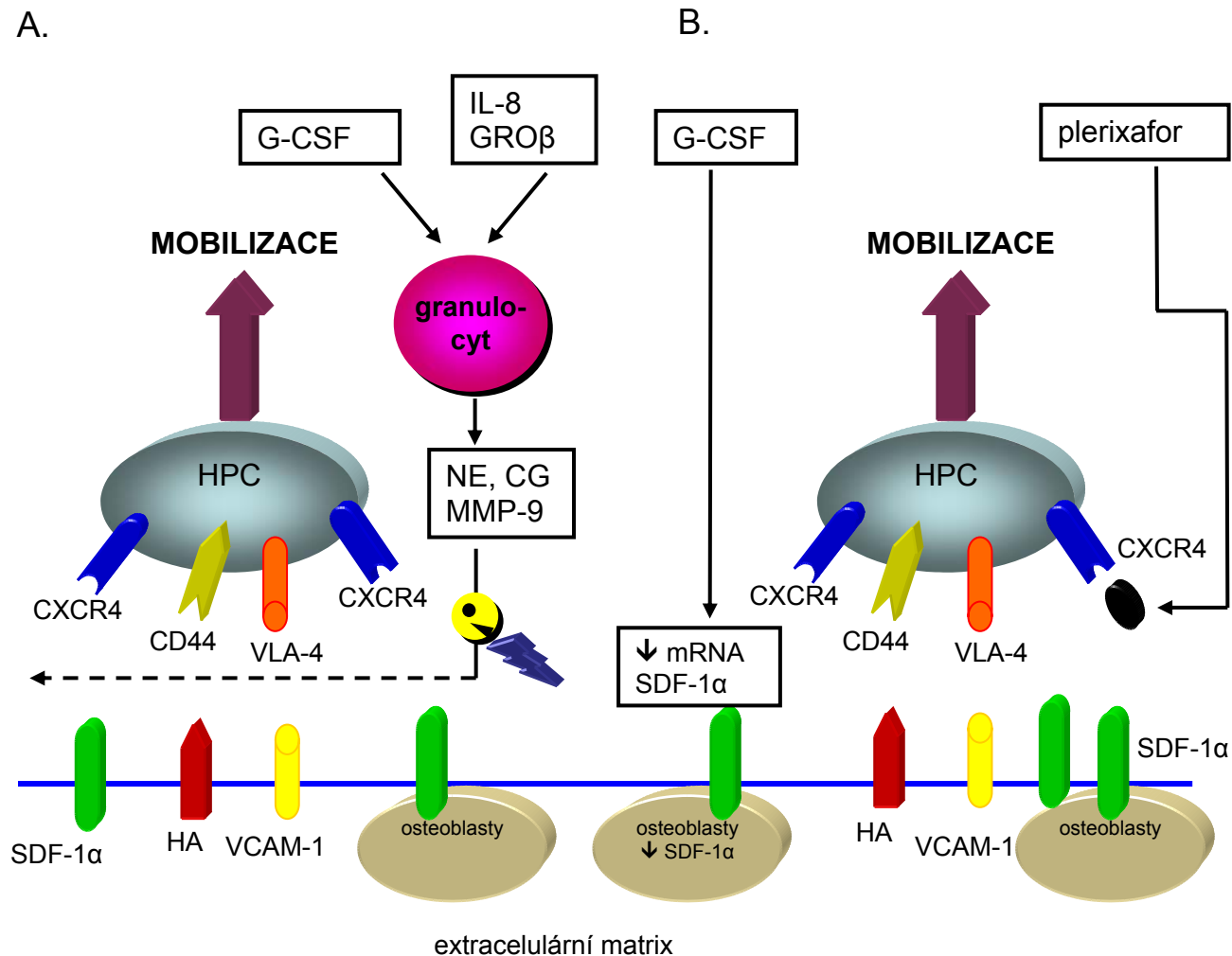
Mobilizace a homing hemopoetických progenitorových buněk jsou zrcadlové procesy regulované souhrou řady cytokinů, chemokinů a proteáz. Pro homing je nezbytná aktivace adhezivních molekul a SDF-1α/CXCR4 osy, mobilizace cytokiny je zprostředkována neutrofilními proteázami degradujícími adhezivní vazby (modifikováno dle Weidt C., Cur Stem Cell Res Ther 2007).





Obrázek 2. Osteoblastické a vaskulární okrsky („niches“) v kostní dřeni

HPC se nacházejí ve specifických oblastech kostní dřene označovaných jako „stem cell niches“ (okrsky). V kostní dřeni existují dva typy těchto okrsků: endostální (osteoblastický) a endoteliální (vaskulární). Oba typy okrsků hrají důležitou roli v regulaci mobilizace i homingu HPC zpět do kostní dřene. Při mobilizaci opouští HPC osteoblastický okrsek, dostává se do vaskulárního okrsku a vstupuje podél endoteliálních buněk do cévního řečiště. Homing je opakem tohoto procesu, HPC z periferní cirkulace migrují transendoteliálně do vaskulárního a nakonec zpět do osteoblastického okrsku (modifikováno dle Yin T, J Clin Invest 2006).



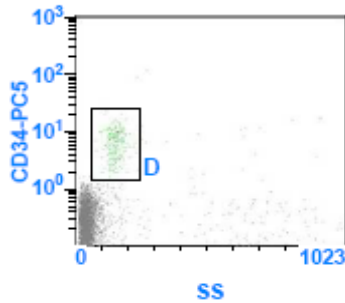
Obrázek 3. Mobilizace CD34+ buněk závislá (A.) a nezávislá (B.) na proteázách

Za klidového stavu jsou HPC vázány v extracelulární matrix adhezivními molekulami exprimovanými stromálními buňkami a osteoblasty. **A.** Mobilizace pomocí cytokinů (G-CSF, IL-8, GROβ) iniciuje uvolnění a akumulaci neutrofilních proteáz, které štěpí adhezivní vazby. **B.** Samotný G-CSF přispívá k mobilizaci down-regulací SDF-1α mRNA ve stromálních buňkách a osteoblastech. Nepřímo působí antagonisté receptorů (jako například plerixafor) nebo inhibitory signálních cest.



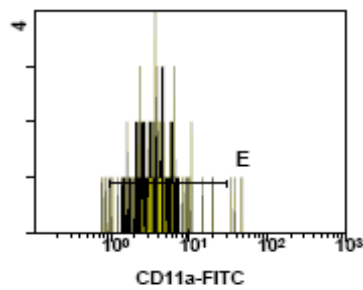
Obrázek 4. Rozdíl exprese znaku CD11a mezi dobře a špatně mobilizovatelným dárce (histogramy z průtokového cytometru, analýza software EXPO 32), modelový příklad.

(F2)[Ungated] Z0082982.LMD : SS/FL4 LOG



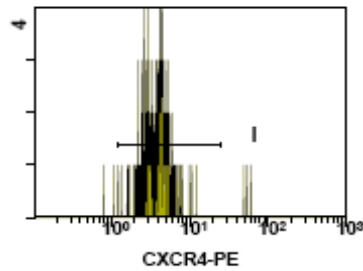
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
D	165	0.16	153.4	0.8	

(F2)[D] Z0082982.LMD : FL1 LOG



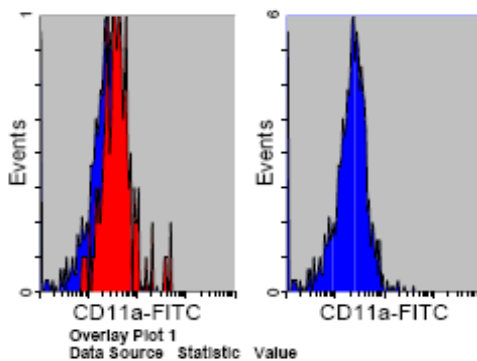
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
E	158	95.76	4.3	0.1	

(F2)[D] Z0082982.LMD : FL2 LOG

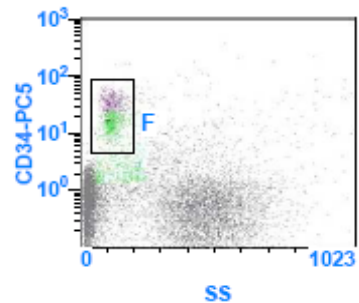


Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
I	160	96.97	4.0	0.2	

Overlay Plot 1

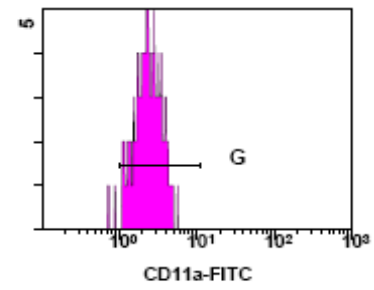


(F1)[Ungated] Z0076203.LMD : SS/FL4 LOG



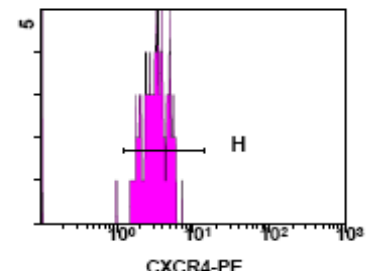
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
F	940	0.28	123.2	1.8	

(F1)[F] Z0076203.LMD : FL1 LOG



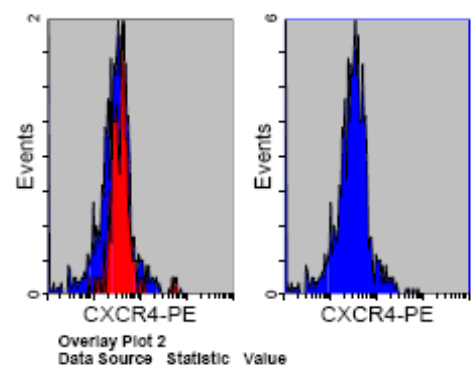
Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
G	762	81.06	2.8	0.2	

(F1)[F] Z0076203.LMD : FL2 LOG

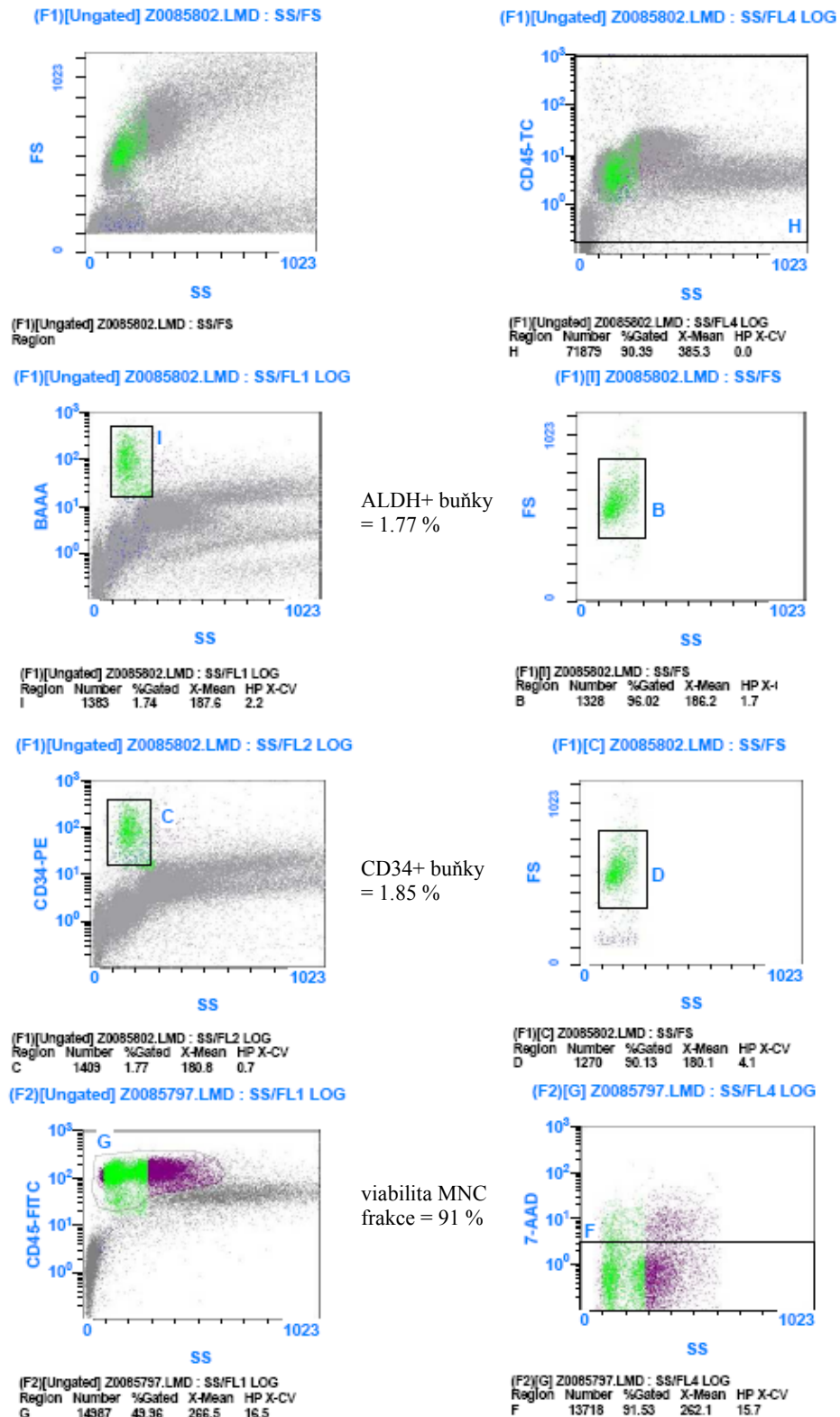


Region	Number	%Gated	X-Mean	HP	X-CV
H	752	80.00	3.7	0.2	

Overlay Plot 2



Obrázek 5. Stanovení hemopoetických kmenových buněk imunofenotypizací pomocí znaku CD34+ a detekcí aldehyd- dehydrogenázy v rámci jednoho vzorku. (histogramy z průtokového cytometru, analýza software EXPO 32), modelový příklad. Procento CD34+ a ALDH + buněk identické, zároveň detekována viabilita buněk pomocí 7-AAD a ALDH (4 barevná analýza: CD45-PC5/CD34-PE/ALDH/7-AAD).



Obrázek 6. Stanovení hladiny cytokinů u dárce xMAP technologií, 6plex kit (Luminex), příklad.

