

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Bojanić**

**Sakupljanje krvotvornih matičnih  
stanica iz krvi postupkom leukaferenze  
velikog volumena krvi**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2009.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Bojanić**

**Sakupljanje krvotvornih matičnih  
stanica iz krvi postupkom leukaferenze  
velikog volumena krvi**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2009.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.

*Mojim roditeljima s ljubavlju.*

Zahvaljujem se:

Prof. dr. sc. Dragi Batiniću, dr. med. na uputama i svojoj pomoći tijekom izrade  
disertacije

Dipl. ing. Klari Dubravčić na pomoći pri izvođenju ovog rada

Prim. mr. sc. Branki Golubić Čepulić na poticaju i svesrdnoj podršci

Dr. sc. Darku Hrenu, prof. na pomoći pri izradi baze podataka i statističkoj  
obradi podataka

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1.	Transplantacija krvotvornih matičnih stanica.....	1
1.2.	Krvotvorni sustav.....	2
1.3.	Krvotvorna matična stanica.....	6
1.4.	Izvori krvotvornih matičnih stanica.....	17
1.5.	Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica u perifernu krv.....	19
1.6.	Obilježja transplantata krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi.....	28
1.7.	Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi.....	30
1.8.	Kontrola kvalitete produkta leukaferoze .....	40
1.9.	Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica u djece.....	46
1.10.	Leukaferoze velikog volumena krvi.....	48
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	55
<b>3.</b>	<b>ISPITANICI I METODE</b> .....	56
3.1.	Ispitanici.....	56
3.2.	Metode.....	58
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	69
4.1.	Obilježja postupka leukaferoze velikog volumena i sakupljenog produkta.....	69
4.2.	Korelacija broja CD34+ stanica u krvi s ukupnim prinosom CD34+ stanica.....	70
4.3.	Periferna krv bolesnika prije i tijekom leukaferoze.....	71
4.4.	Obilježja produkta leukaferoze uzastopno sakupljenog u 6 vrećica.....	80
4.5.	Kumulativni prinos CD34+ stanica .....	89
4.6.	Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica postupkom leukaferoze .....	90
4.7.	Usporedba uspješnosti sakupljanja CD34+ stanica obradom 4 naspram 6 volumena krvi bolesnika.....	92
4.8.	Faktor novačenja.....	94
4.9.	Subpopulacije CD34+ stanica u produktu leukaferoze.....	95
4.10.	Brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih postupkom leukaferoze.....	97
4.11.	Mikrobiološka analiza produkta leukaferoze.....	99
4.12.	Neželjene reakcije.....	99
4.13.	Vrijednosti elektrolita prije i nakon leukaferoze.....	99
4.14.	Vrijednosti koagulacijskih pokazatelja prije i nakon leukaferoze.....	101
4.15.	Vrijednosti hematokrita prije i nakon leukaferoze.....	104
4.16.	Transplantacija KMS i oporavak funkcije krvotvornog sustava.....	105
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	107
5.1.	Osvrt na rezultate provedenog istraživanja leukaferoze velikog volumena.....	108
5.2.	Leukaferoze velikog volumena i prinos CD34+ stanica.....	111
5.3.	Dinamika promjene broja stanica u perifernoj krvi tijekom leukaferoze velikog volumena.....	112
5.4.	Dinamika promjene prinosa i učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica tijekom leukaferoze velikog volumena.....	114
5.5.	Subpopulacije CD34+ stanica sakupljenih tijekom leukaferoze velikog volumena.....	116

5.6.	Novačenje CD34+ stanica tijekom leukaferenze velikog volumena.....	120
5.7.	Važnost leukaferenze velikog volumena u bolesnika s multiplim mijelomom.....	126
5.8.	Usporedba uspješnosti sakupljanja KMS obradom 4 naspram 6 volumena krvi bolesnika.....	128
5.9.	Nedostaci primjene leukaferenze velikog volumena.....	130
5.10.	Nuspojave leukaferenze velikog volumena.....	131
5.11.	Mjesto leukaferenze velikog volumena u sakupljanju transplantata KMS ...	136
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>137</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>141</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>142</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>159</b>
<b>11.</b>	<b>PRIVITAK.....</b>	<b>161</b>
<b>12.</b>	<b>POPIS KRATICA.....</b>	<b>165</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (KMS) je metoda koja se već više od 25 godina koristi u liječenju kongenitalnih i stečenih malignih bolesti krvotvornog i imunosnog sustava, kao i nekih solidnih tumora. S obzirom na izbor darivatelja razlikuju se transplantacija alogenih i transplantacija autolognih KMS. Alogenom transplantacijom se manje vrijedne KMS zamjenjuju zdravim stanicama srodnih ili nesrodnih darivatelja. Transplantacija autolognih KMS je metoda liječenja pri kojoj se bolest eradiciira visokim dozama kemoterapije i/ili zračenja, a pri tome nastalo ireverzibilno oštećenje koštane srži se prevladava infuzijom prethodno sakupljenih i zamrzavanjem očuvanih KMS bolesnika.

Istraživanja na laboratorijskim životinjama provedena četrdesetih i pedesetih godina prošlog stoljeća utrla su put za transplantaciju KMS u ljudi. Prva uspješna transplantacija koštane srži učinjena je 1959. godine kod identičnih blizanaca<sup>1</sup>, a tijekom slijedeća dva desetljeća postupno se razvila u standardnu metodu liječenja.

Krvotvorne matične stanice su 1962. godine otkrivene u perifernoj krvi miša<sup>2</sup>, a 1971. godine i u ljudi.<sup>3</sup> Valja istaknuti da se KMS u perifernoj krvi nalaze u značajno manjem broju nego u koštanoj srži.<sup>4</sup> Razvoj aparata za aferezu, tzv. staničnih separatora omogućio je sakupljanje velikog broja prastanica iz periferne krvi.<sup>5</sup> Tijekom 1985. i 1986. godine nekoliko je centara iz različitih krajeva svijeta izvjestilo o uspješnoj transplantaciji autolognih KMS sakupljenih iz periferne krvi.<sup>6-8</sup> Prva transplantacija alogenih KMS sakupljenih s 10 postupaka afereze iz periferne krvi nestimuliranog darivatelja učinjena je 1989. godine.<sup>9</sup> Nakon što je uočeno da se primjenom činitelja rasta može povećati broj krvotvornih prastanica u perifernoj krvi 1993. godine učinjena je prva uspješna transplantacija alogenih KMS sakupljenih iz periferne krvi nakon mobilizacije s činiteljem stimulacije granulocitnih kolonija (*engl. granulocyte colony stimulating factor; G-CSF*).<sup>10</sup> Primjena KMS iz periferne krvi postala je učestalija nakon 1995. godine kad su

objavljeni rezultati nekoliko istraživanja o uspješnoj transplantaciji KMS sakupljenih nakon mobilizacije G-CSF-om.<sup>11-13</sup>

## 1.2. Krvotvorni sustav

Stanice svih krvnih loza nastaju proliferacijom i diferencijacijom krvotvornih matičnih stanica (KMS) (*engl. haematopoietic stem cells, HSC*) u specijaliziranom krvotvornom tkivu procesom koji se naziva hematopoeza. Budući da zrele krvne stanice imaju ograničen životni vijek, one se moraju trajno obnavljati, a opseg i brzinu obnove najbolje ilustrira podatak da se u čovjeka svaki dan mora nadomjestiti  $2 \times 10^{11}$  eritrocita i  $10^{10}$  leukocita.<sup>14</sup> Istovremeno KMS moraju osigurati i svoj opstanak određenim brojem dioba bez diferencijacije što im omogućuje njihova sposobnost samoobnavljanja (*engl. self-renewal*). Usmjerenje loze (*engl. lineage commitment*) i diferencijacija KMS i njezinih potomaka ovise o unutarnjim svojstvima stanica i vanjskim činiteljima iz specijaliziranog mikrokoliša. Ravnoteža između samoobnavljanja i diferencijacije KMS jest dinamičan proces koji se odvija u okviru fizioloških potreba organizma.

### 1.2.1. Hijerarhijski odnos stanica krvotvornog tkiva

S obzirom na stupanj diferencijacije, stanice krvotvornog tkiva su hijerarhijski organizirane. Možemo ih razvrstati u tri glavna odjeljka: a) odjeljak matičnih stanica (*engl. stem cells*); b) odjeljak prastanica (*engl. progenitor cells*) koji obuhvaća i stanice-preteče (*engl. precursors*); i c) odjeljak zrelih krvnih stanica. Odjeljak matičnih stanica čine multipotentne KMS i njihovo potomstvo s dvije usmjerene KMS, od kojih je mijeloidna matična stanica zajednička za sve stanice mijeloidne loze, a limfoidna matična stanica za sve limfocite. Glavno obilježje ovog staničnog odjeljka jest sposobnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u sve krvotvorne loze. Matičnu stanicu karakteriziraju tri svojstva: velika sposobnost samoobnavljanja, sposobnost multilinijske diferencijacije i sposobnost obnove dugotrajne hematopoeze u letalno ozračenom primatelju. Samoobnavljanje je proces stvaranja stanice-kćeri s istovrsnim karakteristikama,

čime se obnavlja odjeljak matičnih stanica. U stanju ravnoteže, većina KMS miruje u G<sub>0</sub>-fazi staničnog ciklusa, dok samo manji broj stanica obnavlja hematopoezu.

Diferencijacijom multipotentnih matičnih stanica nastaju usmjerene prastanice (*engl. committed progenitor cells*) koje su poznate i kao stanice koje *in vitro* stvaraju kolonije specijaliziranih stanica (eritrocitne, granulocitne, monocitne i megakariocitne loze). Od usmjerenih prastanica nastaje mnogo nezrelih krvotvornih stanica ili stanica-preteča. Glavno obilježje odjeljka prastanica i stanica-preteča jest njihova proliferativna aktivnost praćena diferencijacijom. Diferencijacija jest regulirani proces sazrijevanja i usmjeravanja KMS u jednu krvnu lozu. U tom procesu najprije nastaje multipotentna matična stanica koja se diferencira u neku od usmjerenih prastanica. Diferencijacijom stanica gubi se sposobnost samoobnove i multilinijski potencijal, uz očuvanje proliferacijskog potencijala. Usmjerene prastanice daju velik broj nezrelih stanica preteča koje sazrijevaju u zrele stanice i koje se potom otpuštaju u perifernu krv.

### **1.2.2. Prenatalni razvoj krvotvornog sustava**

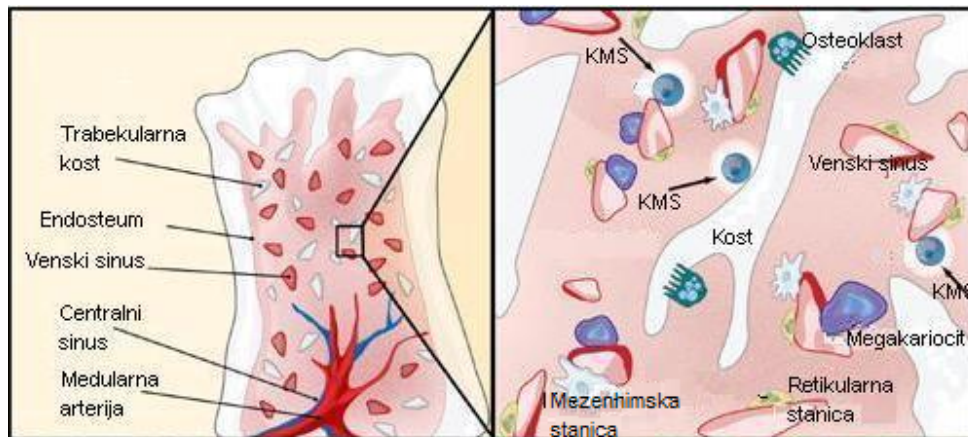
Biološko ponašanje i smještaj krvotvornih stanica se mijenja tijekom razvoja krvotvornog sustava. Tako se primjerice tijekom embriogeneze u relativno kratkom vremenu mijenja kako sjedište hematopoeze tako i vrste nastalih stanica.<sup>14</sup> Naime, KMS se prvo pojavljuju ekstraembrionalno u žumanjčanoj vreći te intraembrionalno u paraaortalnoj spalanhopleuri, a potom migriraju putem krvi u jetru te naposljetku u koštanu srž. Hematopoeza u ljudi započinje unutar žumanjčane vreće u obliku krvnih otočića koji se pojavljuju već 15. dan nakon oplodnje.<sup>15</sup> Nakon žumanjčane vreće, hematopoeza se pojavljuje u dorzalnom mezenteriju embrija unutar aortalno-gonadalno-mezonefritičkog područja (AGM). U ljudi se KMS koje izražavaju biljeg CD34 nalaze u području AGM između 30. i 37. dana trudnoće.<sup>14</sup> Migracija KMS iz žumanjčane vreće i područja AGM u fetalnu jetru odvija se tijekom 5. tjedna trudnoće, nakon čega krvotvorna aktivnost obaju primitivnih centara prestaje. Jetra je glavni krvotvorni organ tijekom fetalnog razvoja, pri čemu je hematopoeza uglavnom ograničena



na eritropoezu. Od 8. tjedna fetalnog razvoja KMS fetalne jetre useljavaju se u timus i osnovu kostiju, a od 12. tjedna i u slezenu. Za razliku od fetalne jetre, hematopoeza u fetalnoj koštanoj srži ograničena je na mijelopoezu. Tijekom fetalnog razvoja, duge kosti su građene od hrskavice. Šupljinu u dugim kostima koja nastaje nakon apoptoze hondrocita naseljavaju KMS koje migriraju iz jetre putem krvi i mezenhimske pristanice iz kojih se razvijaju ostale stanice koštane srži i osteoblasti. Koštana srž se pri rođenju sastoji samo od hematopoeznog tkiva koje se tijekom života postupno zamjenjuje masnim tkivom. U odrasloj dobi odnos masnog tkiva i hematopoeznog tkiva koštane srži otprilike je podjednak.

### 1.2.3. Struktura koštane srži

KMS odraslog organizma nalaze se primarno u koštanoj srži. Struktura koštane srži prikazana je na slici 1.<sup>16</sup> Koštana srž je složeni organ koji tvore krvotvorne stanice, stroma i venski sinusi koji ispunjavaju koštane šupljine ispresijecane koštanim lamelama. Stromu čini heterogena skupina stanica: fibroblasti, adipociti, makrofagi, endotelne stanice, retikularne stanice i koštane stanice. Stromalne stanice stvaraju bjelančevine izvanstaničnog matriksa s kojima tvore strukturnu i funkcijsku potporu hematopoezi. Bjelančevine izvanstaničnog matriksa (fibronektin, kolagen, laminin, hemonektin i glikozaminoglikani) su odgovorne za adheziju krvotvornih stanica za stromalne stanice te za vezanje i predočavanje činitelja rasta krvotvornim stanicama.<sup>14</sup> Izravan dodir između strome i krvotvornih stanica osiguravaju adhezijske molekule iz obitelji imunoglobulina kao što su vaskularna adhezijska molekula-VCAM-1 (*engl. vascular cell adhesion molecule-1*) i intercelularna adhezijska molekula-ICAM (*engl. intercellular adhesion molecule*), potom one iz obitelji adresina, integrina i sijalomucina (CD34, CD43 i CD164) te glikoproteina (CD44).<sup>14</sup>



Slika 1. Prikaz strukture koštane srži<sup>16</sup>

Venski sinusi su specijalizirane venule koje tvore retikularnu mrežu fenestriranih krvnih žila koje omogućuju prolazak stanica unutra i van cirkulacije. Čine ih krvne žile koje polaze iz kortikalnih kapilara endosta, a završavaju u sabirnim žilama koje ulaze u sistemsku vensku cirkulaciju. Ovu finu mrežu sinusoidalnih krvnih žila zajedno drže stromalne stanice i ekstracelularni matriks. Stijenka sinusa građena je od endotelnih stanica i retikularnih stanica između kojih je isprekidana, tanka bazalna membrana. Endotelne stanice oblažu unutrašnju stranu sinusa i izražavaju adhezijske molekule VCAM-1 i E-selektin koje sudjeluju u migraciji krvnih stanica u sinuse koštane srži. Zajedno s retikularnim stanicama one su izvor krvotvornih citokina. Tijela retikularnih stanica čine vanjski zid sinusa, a njihovi razgranati citoplazmatski izdanci ga obuhvaćaju i tvore adventicijski pokrov. Te stanice proizvode retikularna vlakna koja, zajedno sa citoplazmatskim izdancima, ulaze u hematopoetski odjeljak i čine mrežu u kojoj su smještene krvotvorne stanice. Uz sinuse se često nalaze megakariociti, retikularne stanice koje produciraju kemokin CXCL12 i mezenhimske prastanice. Hematopoeza se odvija u ekstravaskularnim prostorima. Zrele krvne stanice ulaze u cirkulaciju preko venskih sinusa kroz prolaze koji nastaju u endotelu ili kroz endotelne citoplazmatske pore. Smatra se da održavanje KMS također reguliraju perivaskularne retikularne stanice i mezenhimske prastanice.

Prijelazni dio između kosti i koštane srži naziva se endosteum i u njemu su smještene koštane stanice osteoblasti i osteoklasti. Uz endostalni sloj stanica nalaze se i brojne krvotvorne matične stanice. Dapače, upravo se na tom mjestu smještaju netom transplantirane krvotvorne matične stanice.<sup>17</sup> Osteoblasti potječu iz mezenhimske matične stanice koja nosi biljeg STRO-1, dok su osteoklasti podrijetlom iz krvotvornih prastanica koje izražavaju površinski biljeg CD34+, ali ne i biljeg STRO-1. Osteoblasti i osteoklasti upravljaju činiteljima koji reguliraju održavanje i smještaj KMSa. Osteoblasti luče hematopoetske činitelje rasta kao što su činitelj koji stimulira makrofagne kolonije (*engl. macrophage colony stimulating factor, M-CSF*), činitelj koji stimulira granulocitne kolonije (*engl. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF*), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) koji djeluju poticajno, ali i TGF- $\beta$  (*engl. transforming growth factor beta*) koji ima inhibicijsko djelovanje na stanični ciklus.

Krvotvorne stanice u koštanoj srži čine hematopoetske tračke u kojima su prastanice različitog stupnja zrelosti, od stanica koje mogu inicirati dugotrajnu kulturu (*engl. long term culture initiating cell, LTC-IC*) i koje stvaraju otočiće hematopoeze (*engl. cobblestone area-forming cell, CAFCS*) do usmjerenih klonogenih prastanica (*engl. CFU-GM i BFU-E*). Smještaj krvotvornih stanica u koštanoj srži ovisi i o stupnju njihove diferencijacije. Nezrele stanice nalaze se uglavnom subendostalno u izravnom dodiru s osteoblastima, dok zrelije stanice eritrocitne, mijelocitne i megakariocitne loze tvore nakupine (otočiće) između vaskularnih sinusa. Specifičan prostorni raspored loza krvnih stanica objašnjava se specifičnim adhezivnim signalima i raspoloživosti potrebnih činitelja rasta u pojedinim dijelovima koštane srži.

### 1.3. Krvotvorna matična stanica

Matične stanice se definiraju kao populacija nediferenciranih stanica koje imaju sposobnost samoobnavljanja, neograničenog dijeljenja i diferencijacije u prastanice visoko specijaliziranih stanica.<sup>18</sup> Samoobnavljanje je sposobnost matične stanice da se podijeli na takav način da jedna ili obje stanice kćeri zadrži

sve osobine stanice majke. Multipotentne matične stanice koje nalazimo u tkivu odraslih osoba imaju sposobnost stvaranja više staničnih loza. One se u tkivu većinom nalaze «uspavane» u stanju mirovanja, a u određenim stadijima životnog ciklusa ili nakon ozljede se aktiviraju i nadopunjuju populaciju zrelih stanica. Aktivnosti ovih važnih stanica su kontrolirane unutar ograničenog tkivnog okoliša.

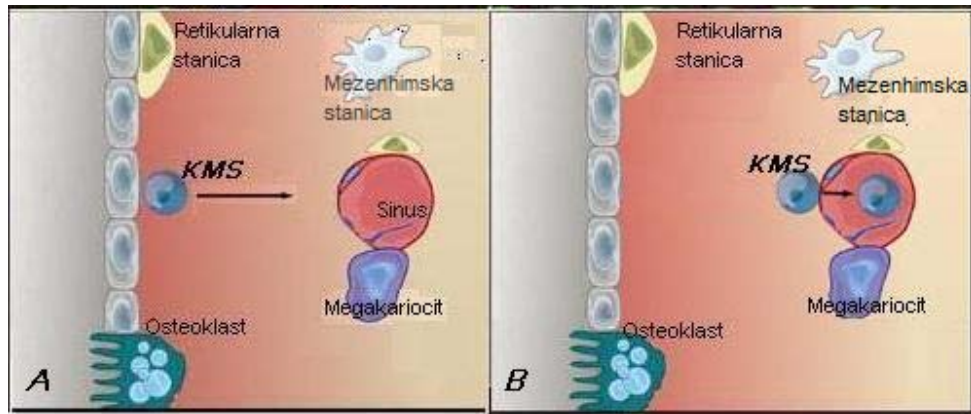
KMS jest prototip multipotentne matične stanice odraslog tkiva. Ona je zajednička ishodišna stanica koja se diferencira u usmjerene prastanice mijelopoeznog i limfopoeznog sustava iz kojih procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju sve funkcionalno zrele krvne stanice.<sup>19</sup> U koštanoj srži matične stanice čine samo 0,003% stanica, a samo 2% ovih stanica se u jednom trenutku aktivno dijele.<sup>16</sup> Od kad su Till i McCulloch početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća prvi puta otkrili KMS u koštanoj srži miša, razvijene su brojne metode koje su omogućile upoznavanje mnogih osobina ovih stanica.<sup>20</sup> Danas je poznato da održavanje KMS i reguliranje njihovog samoobnavljanja i diferencijacije *in vivo* ovisi o njihovom specifičnom mikrookolišu koji se naziva hematopoetski induktivni mikrookoliš ili «niša» matičnih stanica.<sup>21</sup>

### **1.3.1. Niša krvotvorne matične stanice**

Schofield je sedamdesetih godina prvi put uveo pojam «niša KMS» za specifičan mikrookoliš KMS u koštanoj srži.<sup>21</sup> Pretpostavio je da su KMS u bliskom kontaktu s kosti te da je kontakt stanice sa stanicom odgovoran za njihov neograničen proliferacijski kapacitet, ali i za inhibiciju sazrijevanja KMS-a. «Niše KMS» su dugo vremena bile tek teorijski model na koji su ukazivali rezultati istraživanja koji su pokazali da transplantirane matične stanice preživljavaju i rastu samo u nekim područjima koštane srži. Tek je nedavno pojam «niše KMS» u koštanoj srži podržan i rezultatima istraživanja vrste stanica i molekula koje ju oblikuju. Otkrivene su mnoge različite vrste signala koji se izmjenjuju između matičnih stanica i stanica «niše», kao i signalni putevi koji nadziru održavanje, samoobnavljanje i diferencijaciju matičnih stanica.

Hematopoetski mikrookoliš je složena prostorna struktura sposobna da udomi KMS i omogući joj samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju u zrele stanice svih krvnih loza. Budući da se tkivne matične stanice odraslog organizma kao što su i KMS rijetko dijele, one mogu biti u stanju mirovanja tjednima ili čak mjesecima, te se smatraju metabolički inaktivnima, a služe kao pričuva stanica koje se reaktiviraju kao odgovor na stres ili oštećenje. Stoga «niša» mora pružiti i uvjete u kojima će KMS biti u stanju mirovanja dok se ne pokaže potreba za samoobnavljanjem, diferencijacijom i proliferacijom. Važno je naglasiti da prostor niše može biti prolazno bez matične stanice, a potom može prihvatiti i održati novo pridošle transplantirane matične stanice.

Tek je primjena molekula na površini stanice iz obitelji SLAM (*engl. signaling lymphocyte activation molecule*) olakšala identifikaciju KMS imunoflorescencijom u tkivnim presjecima. Bojenje presjeka kroz hematopoetsko tkivo koštane srži s ovim markerima otkriva prisustvo KMS u blizini endosteuma (endostalna niša) i oko venskih sinusa (vaskularna niša). Slika 2. prikazuje model «niše» KMS. Područje endosteuma obloženo većinom osteoblastima, tzv. endostalna ili osteoblastična niša sadržava najviše uspavanih KMS i stoga služi za pričuva stanica koje miruju.<sup>22</sup> Istraživanja provedena na više vrsta mutiranih miševa s oštećenjem hematopoeze zbog primarnog oštećenja u razvoju kosti ukazuju da osteoblasti sudjeluju u stvaranju i funkciji mikrookoliša KMS.<sup>23</sup> Dokazano je također da mišji i ljudski osteoblasti izlučuju veliki broj citokina koji potiču proliferaciju krvotvornih stanica u kulturi, čime se potvrđuje da stanice koje stvaraju kost podržavaju i matične stanice. Iako se osteoblasti koji izražavaju N-cadherin smatraju neophodnim i ključnim činiteljom za funkciju «endostalne niše KMS», vjerojatno i druge vrste stanica kao što su osteoklasti, stromalni fibroblasti i endotelne stanice također doprinose stvaranju endostalne «niše», njenoj aktivnosti i arhitekturi.<sup>24</sup>



Slika 2. Prikaz modela endostalne (A) i vaskularne (B) niše koštane srži<sup>16</sup>

Budući da je veliki broj CD150+ KMS dokazan i uz endotel venskih sinusa koštane srži smatra se da postoji i drugi specijaliziran mikrookoliš KMS u koštanoj srži, tzv. «vaskularna niša».<sup>25, 26</sup> Sugiyama i sur. su pokazali da su venski sinusi okruženi retikularnim stanicama koje izlučuju neobično veliku količinu kemokina CXCL12.<sup>27</sup> Budući da su retikularne stanice koje izražavaju CXCL12 prisutne i u blizini KMS uz endosteum ovi rezultati upućuju da i vaskularna i endostalna niša koriste neke zajedničke mehanizme za održavanje KMS.<sup>27</sup> KMS koje su bile u stanju mirovanja odvajaju se od endostalne niše i migriraju prema središtu koštane srži u vaskularnu zonu gdje ponovno uspostavljaju hematopoezu. Budući da je većina proliferirajućih krvotvornih stanica u kontaktu s endotelnim stanicama venskih sinusa, vjerojatno je da vaskularna niša KMS u koštanoj srži sadrži više samoobnavljajućih stanica nego uspavanih KMS. Smještaj CD150+ KMS u blizini sinusa omogućuje im da stalno nadziru u krvi koncentraciju činitelja koji odražavaju stanje krvotvornog sustava. U uvjetima hematološkog stresa, dolazi do brzog i snažnog odgovora, a ako je potrebno više KMS, one se mogu dodatno «regrutirati» iz endostalne niše. Endotelne stanice su poznate da podržavaju preživljenje, proliferaciju i diferencijaciju mijeloidnih i megakariocitnih prastanica, dok stromalne stanice koštane srži otpuštaju činitelje koji inhibiraju sazrijevanje megakariocita. Moguće je da se KMS smještene u vaskularnoj i endostalnoj „niši“ slobodno izmjenjuju i održavaju homeostazu u stalno promjenjivom krvotvornom okolišu. Vaskularna

niša sama ne može održati dugotrajnu hematopoezu, pa se tako laboratorijskim modelima u slučaju nedostatka osteoblasta aktivira ekstramedularna hematopoeza. Zato se smatra da je u koštanoj srži vaskularna niša sekundarna niša koja zahtjeva pritjecanje KMS iz primarne endostalne niše. Udružene vaskularna i endostalna niša tijesno surađuju u nadzoru nad mirovanjem i samoobnavljanjem KMS, kao i nad stvaranjem ranih prastanica za održavanje homeostaze ili pak u njenom ponovnom uspostavljanju nakon oštećenja koštane srži.

Budući da histološka analiza nije do sada otkrila samo jednu anatomski ograničenu specijaliziranu regiju u području endosteuma ili venskog sinusa za koju se može utvrditi da je samo ona sposobna udomiti KMS, očito je da su po površini mnogih venskih sinusa i po većoj površini endosteuma razasute brojne «fakultativne niše». Postojanje «fakultativne niše» u hematopoetskom sustavu može biti kritično za olakšavanje migracije KMS jer KMS recirkuliraju iz jedne «fakultativne niše» do druge, nasumce birajući između mnogo različitih lokacija koje su sposobne poduprijeti njihovo održavanje.

Ova sposobnost aktivacije «fakultativne niše» može biti mehanizam odgovoran za jedinstven kapacitet krvotvornog sustava da kao odgovor na stres dramatično poveća broj matičnih stanica i hematopoezu. U slezeni i jetri se u normalnim uvjetima nalazi mali broj matičnih stanica koje proizvode tek mali broj krvnih stanica, ali u uvjetima stresa koji potiče pojačanu hematopoezu u ovim organima se mogu aktivirati velika područja ekstramedularne hematopoeze. Na primjer, maligne bolesti krvotvornog sustava koje istiskuju hematopoezu koštane srži često dovode do premještanja većine hematopoeze u slezenu i jetru. Kada se to dogodi, unutar ovih organa se može naći značajno povećan broj KMS i drugih krvotvornih prastanica što dokazuje da su jetra i slezena sposobni aktivirati «fakultativne niše» koje mogu poduprijeti i dugotrajno održati KMS i hematopoezu. Točna priroda ovih niša u jetri i slezeni još nije razjašnjena, ali kao i u koštanoj srži, KMS su unutar slezene nađene primarno oko venskih sinusa što upućuje na postojanje vaskularne niše.

### 1.3.2. Signalne molekule i receptori u niši krvotvorne matične stanice

Interakcija KMS i stanica niše, osobito osteoblasta, zahtjeva velik broj molekula (kemokina, citokina, cadherina, integrina, signalnih molekula i receptora). Neki od citokina su integralni membranski glikoproteini na stromalnim stanicama, dok su drugi vezani na molekule izvanstaničnog matriksa. Adhezijske molekule omogućuju fizičku vezu KMS i okoliša vezanjem na ligande na stromalnim stanicama ili na izvanstaničnom matriksu. U njih ubrajamo integrine, selektine, proteoglikane (CD34) i molekule iz imunoglobulinske skupine. Matične stanice imaju integrinske receptore, VLA-4 i VLA-5, čiji je ligand fibronektin, ali i VCAM-1 na stromalnim stanicama.<sup>16</sup>

Ove različite vrste molekula posreduju u najmanje dvije skupine interakcija. U prvu skupinu pripadaju međustanična interakcija posredovana adhezijskom molekulom VCAM1 i njenim receptorom VLA4 te interakcija adhezijskih molekula i izvanstaničnog matriksa kao što je vezanje CD44 za osteopontin koji u matriks izlučuju osteoblasti. Druga je interakcija liganda i receptora koji je izražen na KMS ili osteoblastima kojom su aktivirani intracelularni signalni putevi. Većina izlučenih signalnih molekula se veže na površinu stanice ili izvanstaničnog matriksa pa ne difundira daleko. Stoga su čvrsta adhezija i smještaj KMS uz osteoblaste u niši esencijalni za stvaranje intercelularnog prostora u kojem se može ostvariti učinkovita interakcija liganda i receptora.

Citokin SCF (*engl. stem cell factor*) poznat i pod nazivom c-kit ili KIT ligand može biti vezan za membranu ili slobodan u topivom obliku. Slobodni SCF nastaje alternativnim cijepanjem membranskog oblika SCF. SCF veže i aktivira CD117 (c-Kit, KIT), koji je izražen na svim KMS koje posjeduju sposobnost ponovnog dugotrajnog naseljavanja, kao i na drugim matičnim stanicama. Put SCF/KIT je ključan za dugotrajnu obnovu i održavanje svih krvotvornih stanica u odrasлом organizmu, a to postiže utjecajem na aktivnosti endostalne niše KMS u koštanoj srži. SCF vezan na membrani osteoblasta snažnije aktivira KIT-a na površini KMS nego topivi oblik SCF, a on je i snažan stimulator adhezije KMS-a i



krvotvornih prastanica na stromalne stanice jer aktivira VLA4 i VLA5. Sve to ukazuje da membranski oblik SCF-a može utjecati na adhezivne osobine endostalne niše modificiranjem funkcije specifičnih integrina i da je on važna komponenta koja regulira aktivnost stanica endostalne niše odgovornih za dugotrajnu obnovu KMS u koštanoj srži. Membranski oblik SCF je također potreban za proliferaciju i aktivaciju osteoblasta *in vivo*. No još uvijek nije razjašnjeno je li učinak membranskog SCF direktan (zbog njegove sposobnosti da osigura značajnu aktivaciju KIT izraženog na KMS) ili je indirektan (zbog važne uloge u održavanju osteoblasta u niši).

Jedan od ključnih činitelja za migraciju, zadržavanje i mobilizaciju KMS tijekom homeostaze i nakon oštećenja je kemokin CXCL12 (*engl. chemokine ligand 12*). On je izražen na više vrsta stromalnih stanica koštane srži, kao što su osteoblasti i vaskularne endotelne stanice, a do izražavanja i sekrecije CXCL12 dolazi kao odgovor na gubitak krvotvornih stanica zbog zračenja, kemoterapije ili hipoksije. KMS migriraju specifično prema CXCL12, a ne niti prema ijednom drugom pojedinačnom kemokinu. Biološki učinak CXCL12 posredovan je njegovom sposobnošću da uzrokuje kretanje, kemotaksiju i adheziju KMS. U stanicama koje izražavaju njegov receptor CXCR4 (*engl. CXC-kemokin receptor4*), CXCL12 uzrokuje sekreciju matriks metaloproteinaza i angiogeničnih činitelja kao što je VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*).

Za zadržavanje KMS u koštanoj srži važna je i interakcija između adhezijske molekule na stromalnim stanicama VCAM-1/CD106 i njenog receptora VLA-4 (integrin- $\alpha4\beta1$ ) koji se nalazi na KMS. Istraživanja su pokazala da miševi s delecijom gena za VCAM-1 ili za VLA4 imaju velik broj KMS u perifernoj krvi.<sup>16</sup> Ovi rezultati upućuju da su kemotaktična os CXCR4/CXCL12 i adhezivna interakcija VCAM-1/VLA-4 dva važna puta koja zadržavaju KMS unutar koštane srži.

Istraživanja krvotvornog sustava *in vitro* u staničnoj kulturi pokazala su da su za poticanje samoobnavljanja KMS potrebni signalni putevi Notch i Wnt.<sup>28</sup> Međutim, dokazano je i da delecija Notch-receptora i liganda ili delecija  $\beta$ -

catenina i  $\gamma$ -catenina *in vivo* nema utjecaja na održavanje KMS. To upućuje da samoobnavljanje KMS *in vivo* potiču redundantni signali tako da održavanje ovog tkiva ne ovisi samo o jednom signalnom putu. Raspodjela odgovornosti za održavanje KMS na više primarnih i sekundarnih signala, od kojih je svaki više ili manje važan u različitim uvjetima, ojačava fleksibilnost i snagu krvotvornog sustava.

### 1.3.3. Pokretljivost krvotvornih matičnih stanica

Iako je velika većina KMS smještena u koštanoj srži, ipak te stanice pokazuju značajnu pokretljivost. Kao odgovor na specifične signale iz okoline KMS mogu izaći iz niše i ponovno ući u endostalnu nišu KMS u koštanoj srži procesima koji se nazivaju mobilizacijom odnosno udomljavanjem. Ovi suprotni biološki procesi nadzirani su različitim molekularnim mehanizmima koji se djelomično preklapaju.<sup>16</sup> Na udomljavanje, zadržavanje i mobilizaciju KMS utječe složena kombinacija migracije, adhezije, proteolize i signalizacije koja se odvija između KMS i endostalne niše kao i signala koji potječu iz periferije te se time određuje miruju li stanice u niši ili KMS izlaze iz niše kao odgovor na stres.

Masivna mobilizacija KMS javlja se kao odgovor na oštećenje koštane srži ili na primjenu mijelosupresivnih citostatika ili krvotvornih činitelja rasta. Mobilizacija je posredovana otpuštanjem neutrofilnih proteaza što dovodi do degradacije signala koji čuvaju nišu i adhezivnih veza posredovanih s CXCL12, VCAM1 i membranskim oblikom SCF.<sup>17</sup> Do izlaska KMS iz niše ne dolazi samo tijekom mobilizacije već također i u uvjetima homeostaze kad se mali broj KMS stalno otpušta u cirkulaciju. Iako nije razjašnjena točna fiziološka uloga ovog izlaska, one mogu biti brzo dostupan izvor KMS za ponovno naseljavanje oštećenih područja koštane srži. S druge strane, KMS koje cirkuliraju u krvi mogu biti sekundarna posljedica trajnog fiziološkog remodeliranja kosti, zbog čega dolazi do stalne razgradnje i izgradnju niše KMS te stoga čestog premještanja KMS.

Transplantirane KMS imaju sposobnost povratka i ponovnog naseljavanja u nišu koštane srži, tzv. udomljavanja (*engl. homing*). Udomljavanje je specifično

kretanje ili migracija KMS iz periferne krvi kroz endotelne stanice vaskularnih sinusa (transendotelna migracija) u ekstravaskularne hematopoetske tračke koštane srži. Za udomljavanje KMS u niši koštane srži od velike su važnosti neke od adhezijskih molekula na površini stanice, u prvom redu selektini i integrini. Iako se udomljavanje smatra neselektivnim procesom koji se događa s jednakom učestalošću kod većine vrsta krvotvornih stanica, ipak je transendotelna migracija u ekstravaskularne hematopoetske tračke koštane srži te smještanje u endostalnu nišu KMS u koštanoj srži specifična osobina karakteristična za matičnu stanicu. Nakon naseljavanja koštane srži dolazi do simetrične diobe KMS i proizvodnje velikog broja krvotvornih prastanica i diferenciranih stanica (*engl. engraftment*).

#### 1.3.4. Funkcijski testovi krvotvornih matičnih stanica

Nepostojanje jedinstvenog biljega kojim bi se dokazala KMS rezultiralo je razvojem niza funkcijskih testova na osnovi kojih indirektno zaključujemo o funkcijskoj sposobnosti matičnih stanica. Istinsku multipotentnu KMS definira sposobnost ponovnog naseljavanja koštane srži i dugotrajne obnove stanica svih krvnih loza u primatelja (*engl. long-term repopulating activity, LTR*), što se dokazuje njenom sposobnošću obnove hematopoeze nakon transplantacije u primatelja kod koga je učinjena potpuna mijeloablacija. Eksperimentalni *in vivo* model kojim se ispituje sposobnost KMS da trajno obnovi stanice svih krvnih loza nakon transplantacije u letalno ozračenog primatelja je model transplantacije u imunodeficientne NOD/SCID miševe (*engl. non obese diabetic/severe combined immunodeficient*).

Analogni *in vitro* model je dugotrajna kultura koštane srži (*engl. long term bone marrow culture; LT BMC*) kojom se oponašaju *in vivo* uvjeti hematopoeze i dokazuju stanice koje iniciraju dugotrajnu kulturu (*engl. long-term culture initiating cells, LTC-IC*) i stanice koje stvaraju otočiće hematopoeze (*engl. cobblestone area forming cells; CAFC*). Ovisno o trajanju dugotrajne kulture, razlikujemo LTC-IC iz kultura stanica nakon 12. tjedna uzgoja za koje se smatra da su moguće

KMS, i LTC-IC iz kultura stanica nakon 5.-8. tjedna uzgoja za koje se smatra da su prastanice.

Prvi test za klonalnost krvotvornih prastanica bio je test stvaranja kolonija na slezeni nakon infuzije koštane srži u letalno ozračenog miša.<sup>29</sup> Kolonije su bile, u stvari, klonovi hematopoetskih stanica podrijetlom iz jedne stanice, nazvane CFU-S (*engl. colony forming unit-spleen*). Ovaj test prati stanice s različitim potencijalom repopulacije, ali ne obuvaća primitivnu KMS.

Krvotvorne prastanice (*engl. hematopoietic progenitor cell, HPC*) opisane su kao stanice s ograničenim potencijalom samoobnavljanja, ali velikim proliferativnim potencijalom. Otkrivene su in vitro kao stanice koje stvaraju kolonije blasta (*engl. colony forming unit-blast; CFU-bl*) ili stanice koje imaju veliki proliferativni potencijal i koje stvaraju kolonije (*engl. high proliferative potential – colony forming cells, HPP-CFCs*). CFU-blast su primitivnije stanice, pretežno u stanju mirovanja i mogu stvoriti sekundarne kolonije svih loza. Tip kolonija koje stvaraju HPP-CFC ovisi o kombinaciji i broju citokina koji se koriste za stimulaciju.

Kratkotrajnim uzgojem stanica koštane srži procjenjuje se klonogena sposobnost usmjerenih krvotvornih prastanica bez sposobnosti samoobnavljanja (*engl. lineage committed HPC*). To su stanice koje stvaraju granulocitno-makrofagne kolonije (*engl. colony forming unit-granulocyte/macrophage; CFU-G/M*) ili eritroidne kolonije (*engl. burst forming unit-erythroid; BFU-E*) u polučvrstom mediju s činiteljima rasta.

### 1.3.5. Fenotip krvotvornih matičnih stanica

Razvoj funkcijskih testova prati i napredak u određivanju fenotipa krvotvornih stanica protočnom citometrijom pomoću monoklonskih protutijela koja specifično prepoznaju molekule na površini stanice.

KMS se nalaze u populaciji krvnih stanica koje na membrani izražavaju biljeg CD34. Taj biljeg nalazi se na 0,1% mononuklearnih stanica iz periferne krvi te na 1-2% mononuklearnih stanica iz mobilizirane periferne krvi, koštane srži i krvi iz pupkovine.<sup>14</sup> Populacija CD34+ stanica je heterogena, a sastoji se od

multipotentnih i usmjerenih prastanica, a samo mali odjeljak čine pluripotentne KMS. Te najprimitivnije stanice karakterizirane su izražajem biljega Sca1 (*engl. stem-cell antigen 1*), CD90/Thy-1, CD117/c-Kit, CD133 i Flk-2/Flt-3, odnosno neizražajem diferencijacijskih biljega loze (Lin-), HLA-DR i biljega CD38 (56,61). KMS koje posjeduju sposobnost dugotrajnog ponovnog naseljavanja koštane srži nazivaju se LSK (Lin-Sca1+Kit+) stanice jer se nalaze u populaciji stanica koje izražavaju biljege Sca1 i c-Kit, a ne izražavaju biljege koji se normalno nalaze na stanicama koje su već usmjerene u jednu krvnu lozu.<sup>14</sup>

Iako se smatralo da su samo CD34+ stanice odgovorne za glavninu hematopoetske aktivnosti u koštanoj krži i obnavljanje hematopoeze u imunokompromitiranog subletalno ozračenog NOD/SCID primatelja, ipak su istraživanja pokazala da i populacija CD34- stanica ima aktivnost matičnih stanica te da i iz njih mogu nastati CD34+ stanice.<sup>30</sup> Očito je da fenotip KMS varira sa stupnjem njihove aktivacije te da se CD34 antigen reverzibilno izražava na matičnim stanicama i prastanicama.<sup>31</sup> Moguće je da se biljeg CD34+ izražava na aktiviranim matičnim stanicama koje se samoobnavljaju ili diferenciraju, dok stanice u mirovanju ponovno preuzimaju CD34- fenotip.<sup>32, 33</sup>

### 1.3.6. Plastičnost krvotvorne matične stanice

Pored uloge u obnavljanju tkiva u kojem su smještene, matične stanice karakterizira i nedavno otkriveno jedinstveno biološko svojstvo plastičnosti. Smatralo se da su matične stanice odraslog organizma ireverzibilno usmjerene samo u tkivo u kojem se nalaze. Međutim, istraživanja su pokazala da i matične stanice odraslog organizma imaju sposobnost diferencijacije u zrele stanice koje nisu u izravnoj vezi s tkivom iz kojeg potječu matične stanice. To svojstvo naziva se plastičnost matičnih stanica. Na primjer, stanice koštane srži mogu se *in vitro* i *in vivo* diferencirati u stanice mezenhima (fibroblaste, masne stanice, endotelne stanice, osteoblaste, hondroblaste, stanice glatkih mišića, stanice srčanih mišića), jetrene stanice i neuroektodermalne stanice.<sup>34</sup> Mogućnost diferencijacije matičnih stanica u zrele stanice različitih tkiva pruža nadu u razvoj novih oblika stanične terapije, u prvom redu degenerativnih i metaboličkih bolesti.

#### 1.4. Izvori krvotvornih matičnih stanica

Danas su za potrebe transplantacije na raspolaganju tri izvora KMS, a to su koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Odluka o odabiru izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti darivatelja KMS. U autolognoj transplantaciji danas se preferiraju KMS iz periferne krvi. U alogenoj transplantaciji na odluku utječe dob i sklonost darivatelja te iskustva transplantacijskog centra. Krv iz pupkovine se većinom koristi kao izvor nesrodnih KMS kad u obitelji nema HLA-podudarnog darivatelja, a učestalost primjene ovisi o raspoloživosti podudarnih doza pohranjenih u banci krvi iz pupkovine.

Iako je potvrđena obnova funkcije koštane srži nakon transplantacije KMS iz sva tri izvora, poznato je da postoje brojne kako kvantitativne tako i kvalitativne razlike između transplantata sakupljenih iz različitih izvora KMS.<sup>35</sup> Glavne razlike između izvora KMS prikazane su u tablici 1.

Izvješće European Blood and Marrow Transplantation Group (EBMT) o transplantaciji KMS u 2007. godine pokazalo je da je u Europi u 613 centara u 42 države učinjeno 25563 «prvih» transplantacija i to 15491 (61%) je bilo autolognih i 10072 alogenih.<sup>36</sup> Potrebno je istaknuti da su prema tom izvješću za autolognu transplantaciju u 98% slučajeva korištene KMS sakupljene iz periferne krvi, a samo u 2% slučajeva iz koštane srži. Za potrebe alogene transplantacije prema tom izvješću, koštana srž je korištena u 23% slučajeva, krv iz pupkovine u 6% slučajeva, a periferna krv u 71% slučajeva, što ukazuje na povećanje primjene KMS iz periferne krvi.

Tablica 1. Izvori krvotvornih matičnih stanica

Izvori	Obilježja transplantata
Koštana srž	<p>-„tradicionalni“ izvor KMS</p> <p>-sakupljanje u operacijskoj sali u općoj anesteziji</p> <p>-10-20 mL/kg TT primatelja</p> <p>-stanice s jezgrom: <math>2-4 \times 10^8</math>/kg TT</p> <p>-CD34+ stanice: <math>2-3 \times 10^6</math>/kg TT</p> <p>-CD3+ stanice: <math>1-2 \times 10^7</math>/kg TT</p> <p>-nuspojave sakupljanja: bol, infekcija, ozljeda živca na mjestu vađenja; komplikacije anestezije</p> <p>-prednost: manji broj T limfocita u transplantatu</p>
Periferna krv	<p>-neophodna mobilizacija KMS: kemoterapijom i/ili krvotvornim činiteljima rasta</p> <p>-jednostavno sakupljanje staničnim separatorom: 1-3 leukaferenze</p> <p>-CD34+ stanice: <math>2-10 \times 10^6</math>/kg</p> <p>-CD3+ stanice: <math>20-40 \times 10^7</math>/kg TT</p> <p>-vrlo mali broj nuspojava: tromboza ili infekcija katetera, trombocitopenija, hipokalcemija, hipotenzija</p> <p>-komplikacije primjene krvotvornih činitelja rasta</p> <p>-češća primjena u autolognoj transplantaciji: brži hematološki oporavak, manja kontaminacija tumorskim stanicama</p>
Krv iz pupkovine	<p>-jednostavno sakupljanje bez rizika za darivatelja</p> <p>-lakša dostupnost transplantata u kraćem vremenskom roku</p> <p>-moguća transplantacija i u slučaju djelomične HLA podudarnosti</p> <p>-varijabilan volumen krvi (50-150 mL) i stoga ograničen broj stanica</p> <p>-prosječan apsolutni broj stanica u transplantatu:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-stanice s jezgrom: <math>8 \times 10^8</math></li> <li>-CD34+ stanice: <math>2 \times 10^6</math></li> </ul>

Brojni su razlozi za povećanu primjenu KMS iz periferne krvi. Kod bolesnika s koštanom srži zahvaćenom malignim stanicama, kao i kod koštane srži koja je fibrozirala zbog prethodnog zračenja područja zdjelice, sakupljanje KMS iz periferne krvi ostaje alternativa za sakupljanje transplantata zadovoljavajuće kvalitete koji nije kontaminiran malignim stanicama. Velika prednost sakupljanja KMS iz periferne krvi je u tome što se broj krvotvornih prastanica u perifernoj krvi može ciljano povećati *in vivo* postupkom mobilizacije primjenom mijelosupresivnih doza kemoterapije i/ili određenih citokina.<sup>37, 38</sup> Budući da se u produktu leukaferenze uz KMS nalaze i usmjerene mijeloidne prastanice i stanice-preteče, nakon transplantacije KMS iz periferne krvi oporavak funkcija koštane srži je brži nego nakon transplantacije koštane srži što je jedan od glavnih razloga da se danas čak u slučaju kad je koštana srž bolesnika prihvatljiva za transplantaciju preferiraju KMS sakupljene iz periferne krvi.

### **1.5. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica u perifernu krv**

U uvjetima homeostaze u cirkulaciji se nalazi tek mali broj KMS pa se u perifernoj krvi nalazi manje od 0,05% CD34+ stanica.<sup>39</sup> Prva transplantacija alogenih KMS prikupljenih iz periferne krvi 1989. godine učinjena je zbog jedinstvene kliničke situacije kada je HLA-identičan srodni darivatelj odbio sakupljanje KMS iz koštane srži u općoj anesteziji, ali je pristao na sakupljanje KMS iz periferne krvi postupkom leukaferenze.<sup>9</sup> KMS su sakupljene iz periferne krvi tog nestimuliranog darivatelja tijekom 10 postupaka afereze. Biopsija koštane srži primatelja učinjena 27. dana nakon transplantacije sakupljenih stanica je pokazala prihvaćanje sve tri loze. To je bio dokaz da se KMS mogu sakupiti iz periferne krvi i u uvjetima homeostaze te da se nakon njihove transplantacije može postići trajni oporavak funkcije koštane srži.

Međutim, kao problem pri korištenju krvi kao izvora KMS istaknuo se veliki broj postupaka leukaferenze potrebnih za sakupljanje dovoljnog broja stanica. U svrhu smanjenja broja leukaferenza trebalo je u cirkulaciji povećati broj krvotvornih prastanica i stanica-preteča. Mobilizacija KMS označava poticanje izlaska KMS iz



koštane srži u cirkulaciju i događa se kao odgovor na stres ili oštećenje stanica koštane srži. Brz ali prolazan porast broja KMS u krvi zabilježen je nakon fizičke aktivnosti, stresa izazvanog primjenom adrenokortikotropnog hormona, primjene endotoksina, sintetičkog polianiona dekstran sulfata<sup>40</sup> i protutijela protiv adhezijske molekule VLA-4 (anti-VLA4, anti-CD49d).<sup>41</sup> Za potrebe transplantacije KMS se mogu mobilizirati u perifernu krv na više načina: mijelosupresivnom kemoterapijom, krvotvornim činiteljima rasta, interleukinom-7 (IL-7), IL-3, IL-12, SCF i Flt3 ligandom ili njihovom kombinacijom, te novim agensima kao što su AMD3100 i pegilirani krvotvorni činitelji rasta.

#### **1.5.1. Mobilizacija mijelosupresivnom kemoterapijom**

O značajanom porastu broja krvotvornih prastanica u perifernoj krvi 2 do 3 tjedna nakon mijelosupresivne kemoterapije izvješteno je još 1976. godine.<sup>42</sup> Citotoksični lijekovi oštećuju stanice koštane srži, a kao reakcija na oštećenje preostale se KMS umnožavaju da bi obnovile koštanu srž. Tijekom rane faze oporavka hematopoeze dolazi do mobilizacije KMS iz koštane srži u krv.

Za mobilizaciju se koriste različiti kemoterapijski protokoli, a najčešće ciklofosamid u dozi od 4 do 7 g/m.<sup>2</sup>,<sup>37</sup> Primjena citotoksične kemoterapije je učinkovita metoda mobilizacije za bolesnike koji su prethodno primili minimalne doze kemoterapije i koji nisu zračeni. Međutim, bolesnici koji su prethodno primili visoke doze kemoterapije ili radioterapije mogu biti refraktorni na mobilizaciju samo kemoterapijom s ili bez dodavanja citokina.

#### **1.5.2. Mobilizacija krvotvornim činiteljima rasta**

Godine 1988. opaženo je da citokini koji djeluju kao krvotvorni činitelji rasta povećavaju broj prastanica u krvi bolesnika s malignim bolestima.<sup>43</sup> Otkriveno je nekoliko egzogenih krvotvornih citokina koji mogu uz minimalnu toksičnost mobilizirati krvotvorne prastanice u cirkulaciju. Za mobilizaciju se najčešće koriste činitelj stimulacije granulocitnih kolonija (*engl. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF*) i činitelj stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (*engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF*). Utvrđeno je da je G-CSF učinkovitiji od GM-CSF-a u mobilizaciji prastanica u

sakupljanju autolognih KMS u bolesnika s različitim vrstama malignih bolesti. Od drugih citokina koji se eksperimentalno primjenjuju za mobilizaciju najčešće se spominju trombopoetin (TPO), FLT 3 ligand (FLT-3l), SCF i IL-8, IL-7, IL-3 te IL-12.<sup>44</sup>

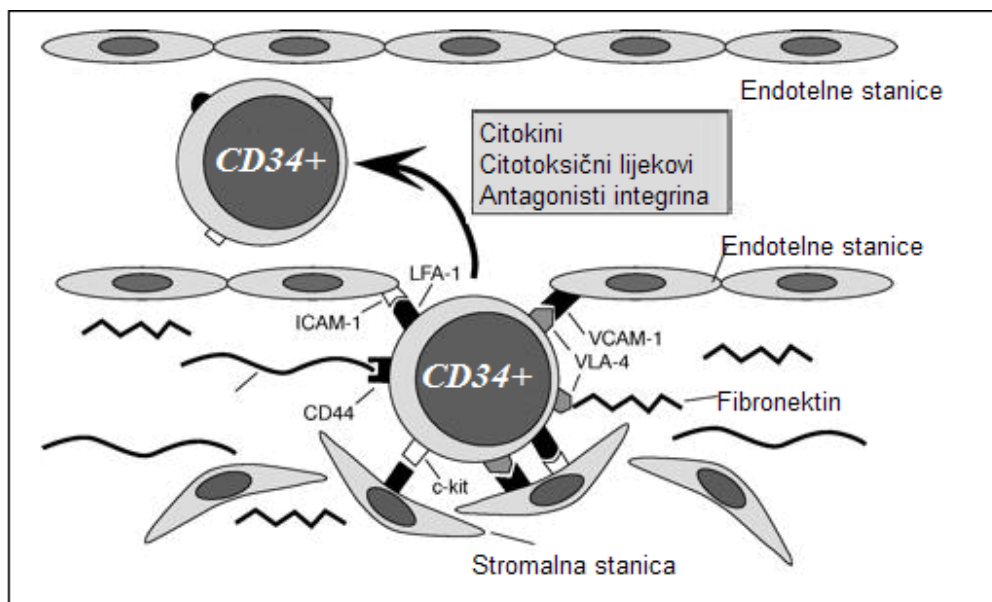
U posljednje se vrijeme u kliničkoj praksi za mobilizaciju najčešće primjenjuje filgrastim (NEUPOGEN, Amgen Inc., Thousand Oaks, California, SAD), ljudski G-CSF proizveden rekombinantnom DNA tehnologijom. Filgrastim proizvodi bakterija *Escherichia coli* u koju je ubačen gen za G-CSF. Njegova sigurnost i učinkovitost potvrđena je tijekom 20 godina dosadašnje primjene. U autolognih darivatelja G-CSF se primjenjuje dnevno supkutano u dozi od 10 µg/kg/dan sam tijekom 5 dana ili u kombinaciji s mijelosupresivnom kemoterapijom. Porast KMS u perifernoj krvi je veći kada se kemoterapija kombinira s primjenom krvotvornih činitelja rasta.<sup>37</sup> Krvotvorni činitelji rasta omogućili su mobilizaciju KMS u perifernu krv i kod zdravih darivatelja. Filgrastim se u alogenih darivatelja najčešće primjenjuje supkutano u dozi od 10 µg/kg na dan kroz 4 do 5 dana.<sup>17</sup>

Primjena G-CSF-a se dobro podnosi, iako se blaga do umjerena bol u kostima javlja u čak 80% darivatelja. Osim boli u kostima opisane su i druge nuspojave G-CSF-a: glavobolja, slabost, mučnina i povećanje temperature. Te nuspojave ublažava peroralna primjena analgetika, obično paracetamola, a nestaju jedan do dva dana nakon posljednje injekcije G-CSF-a. Valja spomenuti da G-CSF uzrokuje prolazno povećanje alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze koje se 4 tjedna nakon prestanka primjene vraćaju na osnovne vrijednosti. Kao ozbiljnu nuspojava primjene G-CSF-a valja istaknuti povećanje slezene do koje dolazi u gotovo svih darivatelja. Budući da su sporadični slučajevi rupture povećane slezene opisani kako u bolesnika tako i u zdravih darivatelja, preporučuje se ultrazvučno praćenje veličine slezene zbog sprečavanja ove ozbiljne nuspojave. Dugotrajni učinak G-CSF-a na zdrave darivatelje još nije poznat, ali do sada nije opažena niti jedna ozbiljna nuspojava u darivatelja kojima su prije 3 do 6 godina KMS mobilizirane u perifernu krv s G-CSF-om.<sup>45</sup>

### 1.5.3. Mehanizam mobilizacije krvotvornih matičnih stanica

Sudbina KMS je većinom regulirana djelovanjem njene neposredne okoline. Većina agenasa koji se zadnjih dvadesetak godina koriste za mobilizaciju KMS aktiviraju mijeloidne stanice uz otpuštanje proteaza.<sup>17</sup> Oni direktno ili indirektno uzrokuju ekspanziju, aktivaciju i degranulaciju mijeloidnih stanica unutar koštane srži, a to dovodi do otpuštanja enzima elastaze, katepsina G i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) iz neutrofilnih granula. Ove proteaze naizmjenično cijepaju i inaktiviraju CXCL12, CXCR4 i VCAM-1 te zato KMS mogu izaći iz koštane srži (Slika 3.).<sup>17</sup> Na primjer, kemokini koji aktiviraju neutrofile kao što su IL-8 ili Gro- $\beta$  (*engl. growth-regulated protein  $\beta$* ) brzo aktiviraju neutrofile pa već 2 sata od njihove primjene dolazi do mobilizacije KMS.<sup>46</sup> Najčešće korišten agens za mobilizaciju jest G-CSF koji stimulira ekspanziju i aktivaciju mijeloidnih i granulocitnih prastanica u koštanoj srži. Nakon nekoliko dana povećava se broj zrelih granulocita u perifernoj krvi koji otpuštaju veliki broj aktivnih neutrofilnih serinskih proteaza i uzrokuju mobilizaciju KMS. Tijekom mobilizacije G-CSF-om inhibirana je funkcija osteoblasta, a to se smatra uzrokom bolova u kostima koji se javljaju u većine davatelja.<sup>47</sup> Mijelosupresivna kemoterapija najprije oštećuje stanice koštane srži, a potom 1 do 2 tjedna nakon završene kemoterapije nastupa oporavak hematopoeze s povećanjem broja mijeloidnih prastanica i izlaskom KMS iz koštane srži u cirkulaciju. Primjena G-CSF ili kemoterapije smanjuje aktivnost inhibitora serinskih proteaza, npr.  $\alpha$  1-antitripsina (*serpina1*), koji bi inače blokirali proteolitičku aktivnost elastaze i katepsina G otpuštenih iz neutrofila. Smanjena aktivnost inhibitora omogućuje u koštanoj srži nakupljanje ove dvije serinske proteaze u njihovom aktivnom obliku. Neizražavanje VCAM-1 nakon primjene G-CSF-a posljedica je otpuštanja elastaze i katepsina G iz neutrofila, jer je ekspresija VCAM-1 održana nakon primjene G-CSF-a u miševa s homozigotnom delecijom gena za ove dvije proteaze. Smanjenje izražaja (*engl. downregulation*) CXCL12, do koje dolazi u stromi koštane srži miševa mobiliziranih G-CSF-om i ciklofosfamidom je složenije jer uključuje proteolizu CXCL12 s proteazama iz

neutrofila kao i istovremeno smanjenu transkripciju CXCL12.<sup>47</sup> To objašnjava zašto miševi kojima od rođenja nedostaju ove proteaze ipak kao odgovor na G-CSF mobiliziraju KMS.<sup>17</sup>



Slika 3. Uloga adhezijskih molekula u mobilizaciji CD34+ krvotvorne matične stanice iz koštane srži u perifernu krv<sup>48</sup>

#### 1.5.4. Činitelji koji utječu na uspjeh mobilizacije krvotvornih matičnih stanica

Više činitelja utječe na uspjeh mobilizacije KMS, a to su dob i spol darivatelja te vrsta, način primjene i doza krvotvornih činitelja rasta. U alogenih su darivatelja muški spol i mlađa životna dob povezani s većim prinosom CD34+ stanica.<sup>39</sup> Ženski spol je identificiran kao prediktor za slabiju mobilizaciju prema rezultatima istraživanja Stockerl-Goldstein i sur. koji izvješćuju da je kod bolesnica manja vjerojatnost da će dobro mobilizirati KMS u odnosu na muške bolesnike.<sup>39</sup> U autolognoj transplantaciji važni činitelji su bolesnikova dijagnoza i stanje bolesti, vrsta i broj prethodnih kemoterapijskih ciklusa ili zračenja primjenjenih prije mobilizacije. U bolesnika s AML loša mobilizacija KMS opisana je u 17 do 81% slučajeva.<sup>39</sup> Smatra se da je najvažniji prognostički činitelj za lošu mobilizaciju broj prethodnih ciklusa kemoterapije i prethodno zračenje.<sup>39</sup> Izloženost bolesnika toksičnim lijekovima kao što su karmustin (BCNU) i melfalan

vrlo nepovoljno utječe na prinos KMS. Kod bolesnika koji su prethodno primili velik broj (>6) ciklusa kemoterapije dolazi do kumulativnog oštećenja hematopoeze. Stoga sakupljanje KMS treba razmotriti u ranom stadiju bolesti prije nego što nastane oštećenje koštane srži. Primjena G-CSF-a u dvije podijeljene doze rezultira većim prinosom KMS od pojedinačne doze kako u zdravih darivatelja tako i u bolesnika.<sup>44</sup>

Unatoč brojnim mobilizacijskim protokolima još uvijek preostaje dio bolesnika kod kojih nije moguće sakupiti dovoljan broj KMS. Bolesnici se smatraju «lošim» mobilizatorima ako je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi manji od  $20 \times 10^6/L$  ili je broj sakupljenih CD34+ stanica manji od  $2 \times 10^8/kg$  TT.<sup>49</sup> Prema rezultatima istraživanja kod kojih je primjenjena kombinacija kemoterapije i G-CSF-a, čak 20% do 40% bolesnika su «loši» mobilizatori. Valja istaknuti da i kod alogene transplantacije od 5% do 10% zdravih darivatelja ne uspije mobilizirati dovoljan broj CD34+ stanica.

Prevladavanje problema «loših» mobilizatora je izuzetno važno i s ekonomskog aspekta jer su kod njih veći troškovi poslijetransplancijske podrške. Pod time se podrazumijeva značajno duži boravak u bolnici, kao i eventualna potreba za sakupljanjem koštane srži.

Problem pronalaženja pouzdanog prediktora loše mobilizacije vjerojatno je posljedica toga što na varijabilnost odgovora na mobilizaciju utječe više činitelja, primjerice slabija aktivacija granulocita, manja količina proteaza kao i smanjen broj KMS u koštanoj srži ili pak suboptimalni hematopoetski mikrookoliš.

#### **1.5.5. Mogućnosti za poboljšanje mobilizacije krvotvornih matičnih stanica**

U bolesnika koji su u perifernu krv mobilizirali mali broj stanica mogu se primjeniti sljedeći postupci: 1. remobilizacija istim ili intenzivnijim protokolom (citokini i kemoterapija za bolesnike koji su prvo mobilizirani samo s citokinima ili više doze kemoterapije za bolesnike već mobilizirane kemoterapijom); 2. primjena novih mobilizacijskih agensa i 3. leukaferenze velikog volumena krvi.<sup>39</sup>

Najjednostavnije rješenje je ponoviti mobilizaciju KMS s G-CSF-om, sakupiti maksimalni mogući broj CD34+ stanica te bolesnika transplantirati s

produktima leukaferenze prikupljenim tijekom obje mobilizacije. Remobilizacija može biti uspješna u određenoj skupini bolesnika, ali ju prate dodatni troškovi i morbiditet. Analiza sakupljanja autolognih KMS u 269 bolesnika kod kojih se tijekom prve mobilizacije nije sakupio dovoljan broj CD34+ stanica pokazala je da je čak u 81,6% bolesnika i druga mobilizacija bila neuspješna. Kada su spojeni produkti sakupljeni tijekom obje mobilizacije, 28,1% bolesnika još uvijek nije imalo transplantat.<sup>17</sup> Ovi rezultati zorno ilustriraju potrebu za manje zahtjevnim, predvidljivijim i učinkovitijim postupcima mobilizacije osobito kod autologne transplantacije. Stoga se danas razmatra primjena druge generacije mobilizacijskih agenasa kao što su modificirani oblik G-CSF-a, antagonisti CXCR4 koji su usmjereni direktno na KMS te agensi koji povećavanjem broja osteoblasta povećavaju i ukupan broj KMS u koštanoj srži.

#### ***1.5.5.1. Modificirani oblik G-CSF***

Jedan od problema s rekombinantnim G-CSF kojeg proizvode bakterije je taj da se radi o neglikoliziranom proteinu pa ga je zbog relativno brzog uklanjanja iz plazme potrebno primjenjivati dnevno u obliku injekcija. Da bi se usporilo njegovo uklanjanje iz plazme rekombinantni G-CSF je pegiliran, tj. kemijski konjugiran s polietilen glikolom (PEG). Osim što usporava uklanjanje iz plazme, pegiliranje G-CSF-a smanjuje i promjene u njegovoj bioraspoloživosti. Komercijalno dostupan pegilirani G-CSF (pegfilgrastim ili Neulasta; Amgen Inc, Thousand Oaks, California, SAD) je kovalentni konjugat filgrastima i monometoksi-polietilen-glikola koji se primjenjuje u jednoj injekciji od 12 mg.<sup>50</sup> Pegiliranjem filgrastima nastaje veća molekula od približno 39 kDa s poluživotom od oko 33 sata. Duži poluživot pegfilgrastima omogućuje bolje planiranje, a za bolesnike je pogodniji zbog smanjenog broja potrebnih injekcija; to značajno pridonosi bolesnikovoj udobnosti te omogućuje veću fleksibilnost vremena sakupljanja bez opasnosti da će se propustiti optimalno vrijeme sakupljanja. Istraživanja provedena na miševima i zdravim dobrovoljcima pokazala su da je jedna injekcija pegfilgrastima učinkovita u stimulaciji mobilizacije KMS. Štoviše, maksimalni broj KMS u perifernoj krvi je i 3 puta veći nego nakon dnevne

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

#### ***1.5.5.2. Antagonisti CXCR4 receptora***

Većina mobilizacijskih agenasa usmjerena je na akcesorne stanice kao što su granulociti, osteoblasti i stromalne stanice, a ne na same KMS. Kemokinski receptor CXCR4 je idealna meta za direktnu mobilizaciju KMS, budući da je izražen na svim krvotvornim prekursorima i neophodno je potreban za zadržavanje KMS u koštanoj srži. Antagonisti CXCR4 snažno sinergistički djeluju s G-CSF-om i imaju mobilizacijski učinak u svih ispitanih vrsta sisavaca i u ljudi. Od svih do sada identificiranih antagonista CXCR4, spoj AMD3100 je jedini koji je već u trećoj fazi kliničkih istraživanja.<sup>17</sup> Molekula AMD3100 prvi je put opisana zbog njene snažne i selektivne inhibicije replikacije virusa HIV tipa 1 i 2 koja nastaje zbog vezanja na kemokinski receptor CXCR4 koji koristi virus HIV-a za ulaz u CD4+ stanicu. Interakcija između CXCL12 i CXCR4 regulira udomljavanje i migraciju matičnih stanica. AMD3100 reverzibilno inhibira vezanje CXCR4 s njegovim ligandom CXCL12 što uzrokuje mobilizaciju CD34+ stanice u perifernu krv. Primijenjen u ljudi kao jedna subkutana injekcija, maksimalnu koncentraciju u plazmi doseže već za 30 do 60 minuta, dok mu je poluživot 3 sata. Nakon injekcije optimalne doze AMD3100 od 240 µg/kg u zdravih darivatelja se između 4. i 6. sata broj CD34+ stanica poveća 12 puta.<sup>51</sup> Sakupljanje CD34+ stanica jednako je učinkovito nakon mobilizacije s jednom dozom AMD3100 (240 µg/kg) kao i nakon 5 dana primjene G-CSF-a. AMD3100 primjenjen 5. dan značajno povećava broj CD34+ stanica i u darivatelja koji su prethodno tijekom 4 dana stimulirani G-CSF-om. Zanimljivo je da CD34+ stanice mobilizirane istodobnom primjenom G-CSF-a i AMD3100 u usporedbi s CD34+ stanicama mobiliziranim samo s G-CSF-om pojačano izražavaju gene koji stanicu štite od apoptoze, reguliraju stanični ciklus i oštećenje DNA, kao i transport kisika.<sup>52</sup> Budući da je CXCR4 izražen i na mnogim tumorskim stanicama, osobito osteotropnim tumorima, postoji potencijalni rizik mobilizacije i ovih malignih stanica.<sup>17</sup>

U tijeku su ispitivanja i novih antagonista CXCR4, tzv. CXCL12 mimetskih peptida rezistentnih na egzopeptidazu (*engl. exopeptidase-resistant CXCL12-mimetic peptide.*). Jedan od njih je CTCE-0021 koji brzo mobilizira polimorfonuklearne neutrofile i krvotvorne prastanice u perifernu krv te ima sinergistički učinak s G-CSF-om.<sup>46</sup>

### **1.5.5.3. Mobilizacijski agensi koji djeluju na kost**

Slabiji odgovor na mobilizaciju može biti ili posljedicom smanjenog broja KMS u koštanoj srži ili oštećenog mikrokoliša koštane srži. Istraživanja na miševima upućuju da tijekom mobilizacije s G-CSF-om oko 20% KMS iz koštane srži migrira u krv.<sup>53</sup> Stoga bi povećanje ukupnog broja KMS u koštanoj srži trebalo pridonijeti mobilizaciji većeg broja KMS u perifernu krv. Istraživanja upućuju da primjena agenasa koji stimuliraju stvaranje kosti može povećati broj KMS u koštanoj srži, što bi potom dovelo i do povećane mobilizacije KMS.<sup>17, 54</sup> Svakodnevna primjena paratiroidnog hormona (PTH) u miševa tijekom 5 tjedana, koji je povećao aktivnost osteoblasta i stvaranje kosti udvostručio je broj KMS mobiliziranih G-CSF-om.<sup>55</sup> Ova istraživanja Adamsa i sur. također je pokazala da primjena PTH poboljšava odgovor na mobilizaciju G-CSF-om u slučajevima kada je prethodna primjena velikih doza kemoterapije iscrpila zalihi KMS.<sup>55</sup> Primjena PTH podržava endostalnu «nišu KMS» povećanjem broja KMS stanica unutar koštane srži i štiti je od štetnog učinka uzastopnih ciklusa kemoterapije. Prva faza kliničkog ispitivanja na 20 bolesnika koji su prethodno loše odgovorili na mobilizaciju G-CSF-om pokazala je da je nakon 14 dana od primjene PTH 40% bolesnika mobiliziralo zadovoljavajući broj CD34+ stanica nakon dodatne primjene samo G-CSF-a.<sup>56</sup> Ovi rezultati upućuju da primjena agenasa koji povećavaju stvaranje kosti može zaštititi KMS od štetnog učinka uzastopnih ciklusa mijelosupresivne kemoterapije te obnoviti učinkovitost mobilizacije u autoložnih darivatelja.



## 1.6. Obilježja transplantata krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi

Neposredni ciljevi reinfuzije KMS su potpuna obnova matičnih stanica u koštanoj srži te najbrži mogući hematološki oporavak neutrofila i trombocita uz što manji broj nuspojava i troškova liječenja koji prate citopenije. Ti se ciljevi mogu postići samo primjenom transplantata koji sadrži dovoljan broj KMS. Unatoč značajnom napretku metoda dijagnostike, točan identitet multipotentne krvotvorne matične stanice i njenih brojnih stanica potomaka usmjerenih u pojedine krvne loze još uvijek nije poznat. Stoga se postavlja i pitanje točne definicije doze matičnih stanica, odnosno optimalnog omjera matičnih stanica i prastanica sakupljenih iz periferne krvi potrebnih za osiguranje trajnog hematopoetskog oporavka u optimalnom vremenskom razdoblju. U praksi se kao indikatori dovoljnog broja matičnih stanica u transplantatu koriste dva empirijski identificirana parametra: broj CD34+ stanica i broj krvotvornih kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica. Za ocjenu kvalitete transplantata ovi pokazatelji se izražavaju kao broj stanica po kilogramu tjelesne težine. Opće je prihvaćena primjena trenutne tjelesne težine, ali razmatra se i primjena idealne tjelesne težine koja se izračunava standardnom formulom koja uključuje visinu i spol primatelja, budući da prema rezultatima više istraživanja bolje korelira s hematološkim oporavkom nakon autologne i alogene transplantacije.<sup>57</sup> Iako ovi pokazatelji dobro koreliraju s brzinom hematološkog oporavka u nizu bolesnika, oni ipak ne mogu uvijek točno predvidjeti ishod transplantacije za svakog bolesnika. Ponekad se opaža varijabilnost u hematološkom oporavku bolesnika čak i kad su ovi pokazatelji koji utječu na brzinu oporavka u zadanim granicama.

Strah od kasnog zatajenja funkcije transplantata KMS iz periferne krvi koji je bio prisutan na početku primjene tih stanica nije se ostvario. Imunofenotip mobiliziranih KMS iz periferne krvi je sličan, ali ne i identičan imunofenotipu stanica iz koštane srži.<sup>58</sup> Prisutnost «ranih» tj. neusmjerenih matičnih stanica u mononuklearnim stanicama sakupljenim leukaferozom potvrđuje se kliničkim opažanjem trajnog hematološkog oporavka nakon mijeloablativne kemoterapije, kao i primjenom sve sofisticiranijih analiza protočnom citometrijom koje nalaze i

do 6% CD34+ lin- stanica u produktu leukaferenze.<sup>58</sup> U produktu leukaferenze se uz manji broj «ranih» matičnih stanica nalazi heterogena mješavina ranih i kasnih usmjerenih prastanica. Smatra se da su ove stanice odgovorne za ubrzanje oporavka hematopoeze koji se vidi nakon transplantacije KMS iz periferne krvi. Oporavak neutrofila nakon transplantacije KMS iz periferne krvi (medijan 8 do 14 dana u većini istraživanja) je značajno brži nego nakon transplantacije koštane srži, a podjednako brz kao nakon transplantacije koštane srži uz primjenu krvotvornih činitelja rasta GM-CSF ili G-CSF.<sup>49</sup> Nakon transplantacije KMS iz periferne krvi opažen je i značajno brži oporavak megakariocita i trombocita. Trombociti dosežu vrijednosti iznad  $20 \times 10^9/L$ , odnosno  $50 \times 10^9/L$  dva tjedna ranije u usporedbi s transplantacijom koštane srži. Ovaj ubrzani oporavak hematopoeze prati smanjena potreba za transfuzijskim liječenjem, manji broj epizoda sepse, značajno manja primjena antibiotika, kao i kraći boravak u bolnici nakon transplantacije.

Empirijski je utvrđeno da za uspješan hematološki oporavak minimalni broj stanica s jezgrom (*engl. total nucleated cell, TNC*) u transplantatu koštane srži iznosi  $2 \times 10^8/kg$ , a optimalni  $3 \times 10^8/kg$ . U procjeni kvalitete transplantata KMS iz periferne krvi broj TNC ima manje značenje jer se u produktu leukaferenze nalazi veliki broj prastanica i stanica-preteča usmjerenih u pojedine loze krvnih stanica. Mobilizacija mijenja vrstu stanica koje se nalaze u mononuklearnoj frakciji stanica u perifernoj krvi, a time i vrijednost određivanja broja mononuklearnih stanica kao mjere kvalitete transplantata. Mobilizacijski protokoli s kemoterapijom i/ili činiteljima rasta povećavaju brojnost i heterogenost stanica, a to potvrđuju rezultati brojnih istraživanja koji upućuju na 10 do 100 puta povećanje broja CFU-GM i/ili CD34+ stanica nakon primjene samo jedne metode mobilizacije ili čak porast od 100 do 500 puta uz sinergistički učinak kombinirane primjene kemoterapije i G-CSF-a.<sup>49</sup>

Broj krvotvornih kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica koristi se kao mjera predikcije kvalitete transplantata još od osamdesetih godina prošlog stoljeća. I danas je mišljenje brojnih kliničara s dugogodišnjim iskustvom u transplantaciji da

je riječ o parametru koji najbolje odražava kvalitetu transplantata što potvrđuje i njegova dobra korelacija s potpunim oporavkom hematopoeze u očekivanom vremenskom razdoblju. U većini istraživanja nije potvrđena prednost određivanja broja CFU-GEMM ili BFU-E umjesto CFU-GM kolonija. Kao kod infuzije koštane srži, odnos između broja CFU-GM kolonija i brzine oporavka hematopoeze je linearan samo unutar određenog raspona. Za koštanu srž minimalna doza CFU-GM kolonija za postizanje oporavka hematopoeze je  $1 \times 10^4/\text{kg}$ . Brzina oporavka raste s porastom broja kolonija od 1 do  $10 \times 10^4/\text{kg}$ , a plato se doseže pri  $15 \times 10^4/\text{kg}$ .<sup>49</sup> Za transplantat KMS mobiliziranih u krv minimalni broj CFU-GM kolonija iznosi  $10 \times 10^4/\text{kg}$ , a plato se doseže pri 30 ili čak  $50 \times 10^4/\text{kg}$ .<sup>49</sup>

Minimalna doza CD34+ stanica u transplantatu KMS iz periferne krvi je  $2 \times 10^6/\text{kg}$ , a optimalna od 3 do  $5 \times 10^6/\text{kg}$ .<sup>49</sup> Opisana je jaka linearna korelacija broja CD34+ stanica s oporavkom granulocita ili trombocita, ali i ovdje kao i kod broja CFU-GM kolonija čini se da postoji prag broja CD34+ stanica iznad kojeg se ne može povećati brzina oporavka. Bender i sur. su u svom pregledu hematološkog oporavka nakon transplantacije KMS prikupljenih leukaferozom našli brži oporavak granulocita i trombocita u bolesnika čiji je transplantat sadržavao više od  $3 \times 10^6/\text{kg}$  TT CD34+ stanica.<sup>59</sup> Kod transplantata koji sadrži od 3 do  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT medijan oporavka trombocita bio je 12 dana, a kod transplantata s  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT medijan je bio 9 dana.<sup>60</sup> Daljnim povećanjem broja transplantiranih stanica dodatno se ne skraćuje vrijeme potrebno za oporavak funkcije koštane srži.

### **1.7. Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi**

Cilj sakupljanja KMS iz periferne krvi je sa što manjim brojem postupaka leukaferoze sakupiti dovoljan broj CD34+ stanica za transplantaciju. Stoga je veoma važno započeti sakupljanje u trenutku kada se u perifernoj krvi bolesnika nalazi najveći broj CD34+ stanica. Do povećanja broja KMS u perifernoj krvi ne dolazi uvijek u isto vrijeme jer bolesnici različito reagiraju na mobilizaciju zbog učinka dobi, dijagnoze, vrste i trajanja prethodnog liječenja. Za odabir optimalnog

vremena za početak sakupljanja nakon mobilizacije kemoterapijom i G-CSF-om predloženo je nekoliko pokazatelja u perifernoj krvi: leukociti, mononuklearne stanice i CD34+ stanice. Budući da se broj leukocita u perifernoj krvi može brzo odrediti, u mnogim centrima leukaferenza započinje na dan kada je broj leukocita veći od  $1 \times 10^9/L$ . Međutim, broj leukocita i mononuklearnih stanica određen neposredno prije početka leukaferenza pokazuje vrlo slabu korelaciju s brojem CD34+ stanica sakupljenih tijekom leukaferenza. Između apsolutnog broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukaferenza i broja CD34+ stanica sakupljenih u produktu dokazana je dobra korelacija. Brojna istraživanja su se bavila pitanjem koji je najmanji broj CD34+ stanica u perifernoj krvi kada ima smisla započeti leukaferenzu.<sup>61</sup> Danas se smatra da su vrijednosti CD34+ stanica manje od  $10 \times 10^6/L$  nedovoljne za početak sakupljanja KMS, te da je najbolje započeti leukaferenzu kada je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi veći od  $10 \times 10^6/L$ .<sup>49</sup> Fabritiis i sur.<sup>61</sup> su pokazali da u bolesnika koji u krvi imaju  $\geq 20 \times 10^6/L$  CD34+ stanica postoji značajna vjerojatnost da se jednim postupkom sakupi ciljni broj CD34+ stanica, dok oni s  $< 20 \times 10^6/L$  CD34+ stanica trebaju za to više od jedne leukaferenza. Nakon svakog postupka leukaferenza određuje se sakupljen broj CD34+ stanica i leukaferenza se nastavlja slijedećih dana dok se ne sakupi ciljni broj stanica. Koliki će broj postupaka leukaferenza biti potreban za sakupljanje ciljnog broja stanica ovisi o stupanju mobilizacije KMS u perifernu krv, pravovremenom početku sakupljanja, kao i tehnici sakupljanja. Primjena učinkovite tehnike sakupljanja je važna jer utječe direktno na sveukupni broj CD34+ stanica u produktu, a time smanjuje broj potrebnih leukaferenza, razdoblje primjene citokina i troškove sakupljanja.

#### **1.7.1. Stanični separatori za sakupljanje krvotvornih matičnih stanica**

Za sakupljanje KMS iz periferne krvi koriste se stanični separatori. Postupkom leukaferenza se iz periferne krvi izdvajaju mononuklearne stanice budući da se CD34+ stanice koje su veličine manjeg limfocita nalaze upravo u frakciji limfocita i monocita, dok se ostale krvne stanice vraćaju bolesniku. Svi stanični separatori djeluju na principu izdvajanja stanica raslojenih

centrifugiranjem krvi kojoj je dodana antikoagulantna otopina. Puna krv se tijekom diferencijalnog centrifugiranja raslojava u slojeve s obzirom na specifičnu gustoću krvnih sastojaka: eritrocite, granulocite, limfocite i monocite, trombocite te plazmu. Ako se želi sakupiti KMS, tada treba sakupljati sloj između granulocita i trombocita. Budući da slojevi stanica nisu oštro razgraničeni, tijekom leukaferenze se sakuplja i dio stanica s obje strane sloja mononuklearnih stanica. Hematokrit produkta se tijekom leukaferenze prilagođava u rasponu od 2% do 3%. Sakupljanje veće količine eritrocita tijekom leukaferenze nije poželjno jer može u darivatelja izazvati anemiju. Previše eritrocita u produktu leukaferenze može također tijekom reinfuzije transplantata u primatelja izazvati nuspojave. Poznato je da eritrociti nakon odmrzavanja hemoliziraju i oslobađaju slobodni hemoglobin u transplantat, a velika količina slobodnog hemoglobina je toksična i u primatelja može oštetiti funkciju bubrega. Tijekom leukaferenze se uz mononuklearne stanice također sakupljaju i trombociti. Važno je da se tijekom leukaferenze sakupi što manje trombocita jer se na taj način izbjegava nastanak trombocitopenija u darivatelja, kao i stvaranje ugrušaka u produktu leukaferenze zbog prevelikog broja trombocita.

#### ***1.7.1.1. Vrste staničnih separatora***

Stanični separatori koji se koriste za sakupljanje krvnih sastojaka kao što su trombociti, eritrociti i plazma mogu se koristiti i za sakupljanje KMS-a. Ovisno o vrsti stanica koje se žele sakupiti koriste se različiti kompjutorski programi koji nadziru rad separatora uz primjenu odgovarajućih setova za jednokratnu primjenu. KMS se iz periferne krvi mogu sakupljati s više vrsta staničnih separatora koji se međusobno razlikuju po venskom pristupu, volumenu krvi koji se nalazi izvantjelesno u staničnom separatoru tijekom sakupljanja, gubitku eritrocita i trombocita te učinkovitosti sakupljanja. Uz bolju učinkovitost sakupljanja, ciljni broj stanica može biti sakupljen u kraćem razdoblju uz obradu manjeg volumena krvi i s manjim brojem potrebnih postupaka leukaferenze. Na tržištu se trenutno nalazi nekoliko staničnih separatora različitih proizvođača.

Gambro: Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO, SAD) je sustav s kontinuiranim protokom koji koristi separacijsku komoru u obliku omče i zahtjeva dvostruki venski pristup. Spectra ima dva programa za sakupljanje KMS. MNC program (Verzija 4.7, 5.1, 6.1 i 7.0) koristi jednokanalnu separacijsku komoru, a Auto PBSC program (Version 6.1) koristi dvokanalnu separacijsku komoru. MNC program je poluautomatski pa operater može nadzirati sakupljanje stanica uz kolorogram (*engl. colored scale*). Operater podešava protok pumpe separatora i na taj način nadzire boju produkta u liniji za sakupljanje. Produkt treba biti svijeto ružičaste boje što odgovara vrijednosti hematokrita od 2% do 3%. Auto PBSC program u cijelosti automatski nadzire postupak sakupljanja na osnovi podataka o bolesniku i broju stanica u perifernoj krvi koji su uneseni na početku procedure.

Baxter: Baxter CS 3000 Plus (Baxter Biotech, Deerfield, IL, SAD) je stanični separator s kontinuiranim protokom s dvije serijske separacijske komore za izolaciju mononuklearnih stanica. Amicus je separator nove generacije koji automatski sakuplja MNC s jednostrukom komorom, a proces izdvajanja odvija se u fazama. Mononuklearne stanice se intermitentno sakupljaju u vrećicu s produktom.

Fresenius: Stanični separator Fresenius AS 104 (Fresenius USA, Walnut Creek, CA, SAD) s kontinuiranim protokom koristi dvostupanjsku separacijsku komoru. U prvoj fazi sakuplja se plazma bogata trombocitima i mononuklearnim stanicama koje se koncentriraju su slijedećoj fazi. COM.TEC separator (Fresenius Hemocare Bad Homburg, Njemačka) ima dva programa, LP-MNX koji koristi jednostupanjsku komoru i LP-KMS-Lym program koji koristi dvostupanjsku komoru.

Haemonetics: Haemonetics MCS Plus (Haemonetics Corp., Braintree, MA, SAD) je separator s intermitentnim protokom koji za separaciju krvi koristi Lathamovu kuglu u obliku zvona. Zbog diskontinuiranog protoka krvi koristi samo jedan venski pristup, ali postupak leukaferenze zbog toga traje značajno duže.

### *1.7.1.2. Venski pristup*

Postupak leukaferenze u odraslih bolesnika zahtjeva kontinuirani protok krvi kroz stanični separator od 50 do 100 mL/min. Ovakav protok krvi se može postići kroz periferne vene kubitalne regije ako su dovoljno široke za igle promjera 16-18 gauge za uzimanje i najmanje 19 gauge za vraćanje krvi. Preporuka je da se uvijek kada je moguće koriste periferne vene jer se na taj način izbjegavaju brojne komplikacije povezane s centralnim venskim pristupom. Više od 60% bolesnika kod kojih se planira sakupljanje KMS postupkom leukaferenze nemaju adekvatne periferne vene kojima bi bilo moguće ostvariti zadovoljavajući protok za pumpe staničnog separatora.<sup>62</sup> Oko 10% zdravih darivatelja alogenih KMS također zahtjeva postavljanje centralnog venskog katetera zbog neadekvatnih perifernih vena.<sup>63</sup> Venski kateteri su jedino praktično rješenje za bolesnike s neodgovarajućim perifernim venama. Većina bolesnika kod kojih se planira postupak leukaferenze već imaju centralni venski kateter zbog primjene kemoterapije. Međutim, u pravilu je riječ o jednostrukim kateterima uskog lumena i mekane stijenke koji nisu pogodni za visoke protoke krvi koji su potrebni za postupak leukaferenze. Najčešće se za centralni venski pristup koriste posebni kateteri namijenjeni za hemodijalizu i aferezu. Oni omogućuju veći protok krvi jer imaju veliki lumen i debele čvrste stijenke kako ih negativni tlak koji stvara stanični separator tijekom uzimanja krvi ne bi sljepio. Kateteri za aferezu mogu biti jedno ili dvoluminalni. Čvrsta stijenka im je izrađena od poliuretana ili silikonske gume. Poliuretanski kateteri su čvršći i namijenjeni za primjenu u kraćem vremenskom razdoblju do 3 tjedna iako se u pravilu vade već nakon završetka sakupljanja.<sup>64</sup> Kateteri proizvedeni od silikonske gume, budući da se mogu sigurno ostaviti na mjestu duže vremensko razdoblje, postavljaju se u slučajevima kad se isti kateter želi koristiti kako za postupak sakupljanja KMS tako i tijekom transplantacije.

Kateteri se mogu postaviti u venu subklaviju, unutarnju jugularnu ili pak u femoralnu venu. Svaka od navedenih lokacija ima svoje prednosti i nedostatke. Tako je primjerice prednost femoralnog katetera što se može brzo postaviti i što

ne zahtjeva radiološku kontrolu položaja. Iako njegovo postavljanje prati manji broj nuspojava, nedostaci su veći rizik infekcije i ograničena pokretljivost bolesnika. Vena subklavija i unutarnja jugularna vena su pogodne za kateter za aferezu, iako je postavljanje često praćeno komplikacijama. Uz pneumotoraks ili hematotoraks, opisane su i druge komplikacije kao što su infekcije i tromboza. No, s druge strane istraživanja pokazuju da je incidencija komplikacija leukaferaze putem katetera postavljenih u veni subklaviji bila je jednaka kao i kod procedura učinjenih putem perifernih vena.<sup>65</sup> Valja istaknuti da postavljanje katetera za aferezu u venu subklaviju može u svakodnevnom kliničkom radu predstavljati problem jer je većina bolesnika već prethodno tom mjestu imala postavljen kateter za primanje kemoterapije pa stoga ne čudi da je kod nekih od njih ta vena trombozirala. Prema rezultatima istraživanja Haire i sur., trombi mogu spriječiti slijedeću kateterizaciju vene subklavije čak u 14% bolesnika.<sup>66</sup> Budući da je poznato da se vene za koje je ultrazvučnim pregledom utvrđeno da su okludirane ne mogu uspješno kateterizirati, kod tih bolesnika treba koristiti alternativne puteve za postavljanje katetera.

Prohodnost katetera se između postupaka leukaferaze održava ispiranjem i konzerviranjem katetera s otopinom heparina. Trombocitopenija izazvana heparinom i tromboza su rijetke, ali teške komplikacije pa neki centri izbjegavaju primjenu heparina za konzerviranje katetera. U istraživanju provedenoj među bolesnicima s malignim bolestima koji su imali centralni venski kateter zbog leukaferaze nije bilo značajne razlike u pojavi tromba oko katetera, bez obzira je li kateter bio konzerviran s heparinom (100 i.j./mL fiziološke otopine) ili samo fiziološkom otopinom.<sup>63</sup>

### ***1.7.1.3. Sprječavanje zgrušavanja tijekom leukaferaze***

Budući da je krv u izvantjelesnoj cirkulaciji izložena ne-endotelnim površinama, tijekom leukaferaze dolazi do aktivacije sustava zgrušavanja krvi. Za sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom postupka leukaferaze neophodna je infuzija velike količine antikoagulantne otopine. Najčešće korišten antikoagulans jest otopina citrata koji sprječava zgrušavanje stvaranjem nedisociranih



kompleksa kalcijevog citrata i inhibiranjem agregacije trombocita. Antikoagulantna otopina izbora za sakupljanje KMS danas je ACD-A (*engl. Acid Citrate Dextrose Formula-A*), sterilna otopina limunske kiseline, natrijevog citrata i dekstroze. Jedna litra ACD-A sadrži 14,15 g citrata iz natrijevog citrata i 7,18 g citrata iz limunske kiseline, a to ukupno iznosi 21,33 g citrata.

Tijekom sakupljanja, puna krv se pumpa u stanični separator uz ulazni protok od 50 do 100 mL/min i miješa se s antikoagulansom u različitim omjerima, najčešće u omjeru 12:1. Uz takav omjer u jednoj minuti se infundira od 4,2 do 6,6 mL ACD-A što znači od 89,5 do 141 mg iona citrata. Tako se, primjerice, u standardnom postupku ukupan volumen krvi odraslog bolesnika obradi 2 do 3 puta, što iznosi 8 do 12 litara krvi uz infuziju od 833 do 1000 mL ACD-A u vremenu od 180 do 240 minuta. Volumen infundiranog citrata razlikuje se ovisno o vrsti staničnog separatora.

U sakupljanju KMS tijekom postupka leukaferoze velikog volumena krvi uspješno se koristi kombinirana formula citrata i heparina. U tom se slučaju ACD-A infundira s punom krvi u omjeru 24:1, a 6 i.j. heparina se dodaje na svaki mililitar ACD-A. Heparin je potrebno također dodati u vrećicu s produktom leukaferoze zbog sprječavanja stvaranja ugrušaka. Heparin se kao jedini antikoagulans koristi samo u bolesnika koji su alergični na citrat.

Sprječavanje zgrušavanja krvi bolesnika tijekom sakupljanja KMS iz periferne krvi je važno kako zbog osiguranja sigurnosti bolesnika tako i zbog kvalitete koncentrata KMS. Nedovoljna ili netočna primjena antikoagulansa tijekom postupka može aktivirati koagulaciju i uzrokovati pojavu ugrušaka tijekom postupka i to kako u staničnom separatoru tako i u sakupljenom produktu. S druge strane, suvišak citrata u krvi bolesnika može uzrokovati simptome hipokalcemija uslijed smanjenja razine ioniziranog kalcija, a u težim slučajevima može uzrokovati i krvarenje.

#### **1.7.1.3.1. Nuspojave citrata**

Iako se tijekom leukaferoze bolesniku vraća citrirana krv, citrat u bolesnika ne uzrokuje sistemsko sprječavanje zgrušavanja jer se metabolizira i redistribuira

u cirkulaciji. Citrat na sebe veže ionizirani kalcij što uzrokuje prolazno smanjenje vrijednosti ioniziranog kalcija u krvi. Hipokalcemija je dobro poznata nuspojava infuzije citrata i javlja se u 39%<sup>67</sup> do 48% bolesnika.<sup>68, 69</sup> Simptomi toksičnosti citrata su parestezije, glavobolja, mučnina i obično imaju mali klinički značaj, ali ponekad mogu izazvati i značajan morbiditet. U djece se toksičnost citrata može, osim parestezijama i mučninom, očitovati nemirom, tahikardijom i hipotenzijom.

Simptomi hipokalcemije mogu se spriječiti jednostavnim mjerama, kao što su smanjenje brzine protoka krvi kroz stanični separator i/ili intravenskom primjenom soli kalcija.<sup>69</sup> Osoblje koje skrbi za bolesnike tijekom afereze mora biti educirano za prepoznavanje znakova i simptoma toksičnosti citrata te mora znati započeti s odgovarajućim liječenjem. Osobitu pozornost treba obratiti kod djece i bolesnika manje tjelesne težine jer su u njih i učestaliji simptomi hipokalcemije.<sup>70</sup>

Iako neki autori kod pojave simptoma hipokalcemije preporučuju tek smanjenje brzine protoka, Haire i Sniecinski smatraju da je za eliminiranje simptoma gotovo uvijek potrebna intravenska primjena kalcija.<sup>71</sup> Kalcij glukonat se primjenjuje jako sporo u dozi od 5 mL što sadrži 45 mg kalcija (2,25 mEq) tijekom 5 do 10 min. Ako simptomi hipokalcemije i nakon te terapije ustraju, potrebno je dodati još 5 mL kalcij glukonata, do ukupno 20 mL.

Danas se smatra da zbog velike učestalosti pojavu simptoma hipokalcemije treba spriječiti profilaktičkom primjenom kalcija. Jedna skupina autora smatra da simptomi hipokalcemije mogu biti vrlo jednostavno spriječeni tako da bolesnik prije postupka leukaferenze popije čašu mlijeka ili otopinu soli kalcija.<sup>71</sup> Međutim, većina autora smatra da peroralna primjena kalcija nije dostatna pa se u većini centara primjenjuje profilaktička infuzija kalcija koja prema rezultatima istraživanja smanjuje incidenciju simptoma hipokalcemije od 65 do 90%.<sup>68</sup> Profilaktička infuzija kalcija može se primjeniti u fiksnoj dozi od 1,1 mg/kg/sat ili u dozi prilagođenoj volumenu infundiranog citrata što iznosi 0,5 mg kalcija/mL ACD-A antikoagulantne otopine. Za djecu se profilaktički primjenjuju više doze kalcija nego u odraslih (0,6 mg kalcija/mL ACD-A).<sup>71</sup> Kod bolesnica s volumenom krvi manjim od 4500 mL svakako je potrebna profilaktička primjena

kalcija jer je kod njih i najveća učestalost simptoma hipokalcemije.<sup>68, 70</sup> Tijekom intravenske primjene kalcija nije nikada opaženo zgrušavanje krvi u setu za aferezu ili u kateteru.

Unatoč dokazanoj učinkovitosti kontinuirane profilaktičke primjene kalcija na smanjenje reakcije izazvanih citratom tijekom leukaferoze, uvijek trebaju biti na umu i moguće nuspojave primjene kalcija. Bolesnike svakako tijekom infuzije kalcija treba upozoriti na mogućnost navale osjećaja topline i pojave metalnog okusa u ustima. Kao osobito ozbiljnu nuspojavu primjene kalcija valja spomenuti mogućnost pojave vazodilatacije te povećani rizik srčanih aritmija. Stoga bolesnici koji su prethodno imali srčanu aritmiju ili srčanu insuficijenciju, a osobito oni liječeni digitalisom, ne bi smjeli tijekom leukaferoze primati intravensku nadoknadu kalcija.<sup>71</sup>

#### ***1.7.1.4. Nuspojave leukaferoze***

Tijekom leukaferoze ne očekuje se značajni gubitak eritrocita pa bi vrijednost hemoglobina trebala ostati konstantna. Izuzetno rijetko može nastati gubitak eritrocita kad se na kraju postupka zbog tehničkih problema sa staničnim separatorom ne može isprati i vratiti krv iz separatora. No, budući da se tijekom leukaferoze uz mononuklearne stanice sakuplja i dio stanica iz sloja trombocita uvijek dolazi do smanjenja broja trombocita. Ovisno o vrijednostima prije afereze broj trombocita se obično smanjuje za 20% do 30% nakon završetka procedure. Minimalni broj trombocita prije započinjanja leukaferoze za bolesnike iznosi  $30 \times 10^9/L$ , a za zdrave darivatelje  $80 \times 10^9/L$ . Ako je broj trombocita manji od prihvatljivog, bolesnik treba primiti transfuziju ozračenih trombocita sa smanjenim brojem leukocita, dok u slučaju zdravog darivatelja leukaferozu treba nastaviti tek nakon oporavka broja trombocita.

Na početku leukaferoze kod većine bolesnika, a osobito kod onih manje tjelesne težine, dolazi do smanjenja tjelesne temperature zbog hlađenja krvi tijekom prolaska kroz cijevi staničnog separatora i infuzije otopina koje su sobne temperature. Hipotermija se može spriječiti primjenom grijača za krv. Zamjećeno je da se primjenom grijača za krv može smanjiti i učestalost simptoma

hipokalcemije. Klinička i laboratorijska istraživanja su pokazala da hipotermija uzrokuje više metaboličkih poremećaja, a između ostalog i smanjuje razgradnju citrata te na taj način doprinosi štetnom učinku hipokalcemije.<sup>72</sup> Stoga je moguće da se grijanjem krvi i smanjenjem rizika nastanka hipotermije smanjuje i rizik pojave simptoma hipokalcemije posebice u bolesnika manje tjelesne težine.

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

#### ***1.7.1.5. Skrb za bolesnike tijekom afereze***

Postupkom leukaferenze se želi sakupiti odgovarajuća doza stanica potrebna za uspješnu transplantaciju, a sam postupak se mora provesti sukladno važećim standardima i preporukama.<sup>73</sup> Bolesnicima prije leukaferenze treba dati edukacijski materijal koji objašnjava postupak i moguće nuspojave sakupljanja. Nakon što su upoznati s detaljima postupka i što su imali mogućnost postaviti pitanja oni trebaju potpisati obaviješeni pristanak za provođenje postupka.

Sakupljanje KMS se provodi u odjelu za aferezu čije osoblje mora biti educirano za provođenje postupka. Od najveće je važnosti da osoblje zna prepoznati znakove i simptome mogućih nuspojava koje se mogu javiti tijekom postupka afereze te da ih zna pravovremeno zbrinuti. Vitalni znakovi (krvni tlak i puls) trebaju biti zabilježeni na početku procedure te potom svakih 30 minuta tijekom sakupljanja. Bolesnikovo stanje treba pratiti i nakon leukaferenze zbog mogućnosti pojave trombocitopenije i anemije koje treba prije slijedećeg postupka leukaferenze zbrinuti transfuzijskim liječenjem ozračenim pripravcima sa smanjenim brojem leukocita.

### 1.8. Kontrola kvalitete produkta leukaferoze

Nakon završenog postupka leukaferoze uvijek je potrebno analizirati kvalitetu sakupljenih stanica jer se može očekivati varijabilnost između produkta leukaferoze sakupljenih u nekoliko uzastopnih dana. Metode analize, obrade i zamrzavanja produkta leukaferoze su slične kao i za koštanu srž jer oba pripravka sadrže mali udio KMS u velikoj populaciji zrelih krvnih stanica. Pripravak leukaferoze je «čišći» budući da ne sadrži čestice masti i dijelove stanica oštećenih tijekom aspiracije koštane srži, a ima i veći udio mononuklearnih stanica zbog tehnike izdvajanja stanica staničnim separatorom.

Prikladnost sakupljenog produkta KMS za obnovu hematopoeze od primarne je važnosti za svakog pojedinog bolesnika koji je prije transplantacije kondicioniran letalnom dozom mijeloablativne kemoterapije. Ako prethodno nije pohranjen rezervni transplantat, neuspjelo presađivanje stanica zbog neodgovarajućeg sakupljanja KMS može biti fatalno za bolesnika koji je već primio mijeloablativnu terapiju. Stoga svaki transplantacijski program mora definirati što se smatra odgovarajućim transplantatom za bolesnike koji su liječeni određenim protokolima. Najvažnije je utvrditi minimalni broj multipotentnih krvotvornih matičnih stanica koji osigurava trajni oporavak hematopoeze, kao i kinetiku oporavka na koju vjerojatno utječu krvotvorne prastanice u različitom stupnju sazrijevanja. Budući da za sada ne postoji opće prihvaćena metoda analize primitivne matične stanice, danas se koriste surogatni testovi ocjene sposobnosti obnavljanja hematopoeze kao što je broj CD34+ stanica u produktu. Jednako je važna i sigurnost primjene pripravka s obzirom na moguće mikrobiološko zagađenje.

Dosljednost u kvaliteti produkta od ključne je važnosti za program transplantacije, pa se stoga mora trajno pratiti i učinkovitost sakupljanja mononuklearnih i CD34+ stanica, kao i koncentracija mononuklearnih stanica, granulocita, trombocita i eritrocita u sakupljenom produktu, vijabilnost stanica, a potrebno je utvrditi i sterilnost svakog produkta.

Uz laboratorijsko ispitivanje kontrole kvalitete pripravka KMS obavezno se mora pratiti hematopoetski oporavak i klinički ishod transplantacije. Krajnja mjera kontrole kvalitete transplantata je brzina i trajnost oporavka funkcije koštane srži, kao i incidencija komplikacija povezanih s infuzijom produkta.

#### **1.8.1. Brojnost krvnih stanica u produktu leukaferoze**

U svakom produktu leukaferoze treba odrediti broj krvnih stanica i diferencijalnu krvnu sliku. Broj stanica s jezgrom i diferencijalna krvna slika daju prvu ocjenu kvalitete sakupljanja, a neophodni su i za praćenje tehnike sakupljanja i ujednačenosti produkta.

KMS se nalaze u populaciji mononuklearnih stanice, dok se granulociti, trombociti i eritrociti smatraju nepoželjnim u produktu leukaferoze. Ako se sakupljanje ostalih stanica, u prvom redu trombocita i eritrocita ne smanji na minimum, kod bolesnika se može javiti trombocitopenija i anemija. Stanice koje su nepoželjne u produktu leukaferoze mogu komplicirati obradu i zamrzavanje KMS. Učinkovitost sakupljanja (*engl. collection efficiency*) staničnog separatora u sakupljanju mononuklearnih stanica iz krvi određuje se dijeljenjem ukupnog broja mononuklearnih stanica u produktu s brojem mononuklearnih stanica koje su obrađene separatorom tijekom leukaferoze.<sup>74</sup> Broj obrađenih mononuklearnih stanica jednak je umnošku prosječnog broja mononuklearnih stanica u perifernoj krvi (prosjeak broja mononuklearnih stanica prije i nakon leukaferoze) i ukupne količine krvi koja je obrađena tijekom leukaferoze. Na isti način se izračunava učinkovitost sakupljanja i drugih krvnih stanica.

Učinkovitost sakupljanja mononuklearnih i CD34+ stanica kao i «kontaminacija» produkta granulocitima, trombocitima i eritrocitima treba se obavezno odrediti tijekom inicijalne evaluacije tehnike sakupljanja, kao i pri svakoj modifikaciji tehnike sakupljanja. Provjera učinkovitosti sakupljanja treba biti dio trajnog programa osiguranja kvalitete u jedinici za aferezu.

Produkt leukaferoze ne sadrži kapljice masti koje nalazimo u koštanoj srži, a koje se mogu greškom ubrojiti u stanice, pa se broj stanica s jezgrom može analizirati ili automatskim brojačima krvnih stanica ili manualno hemocitometrom.

Koncentrirani uzorci mogu zahtijevati razrjeđenje prije brojanja. Diferencijalna krvna slika mora se učiniti manualno.

### **1.8.2. Brojnost krvotvornih matičnih stanica**

Minimalni broj TNC ili MNC stanica potreban za transplantaciju KMS prikupljenih iz krvi ne može se standardizirati kao u slučaju koštane srži i to uslijed razlika koje postoje u mobilizaciji i tehnikama sakupljanja. Ukupan broj sakupljenih TNC i MNC biti će viši u bolesnika koji su primali samo G-CSF bez kemoterapije nego u bolesnika kojima su stanice sakupljene u početnoj fazi oporavka nakon primjene visokih doza kemoterapije. Međutim, produkt sakupljen nakon mobilizacije kemoterapijom obično sadrži veći broj KMS. Valja istaknuti da sadržaj KMS (izražen kao broj CD34+ stanica ili broj CFU-GM kolonija) u populaciji mononuklearnih stanica može jako varirati od bolesnika do bolesnika, ali i između produkata leukaferenze prikupljenih u različitim danima kod istog bolesnika. Stoga je važno u svakom produktu kontrolirati brojnost KMS.

#### ***1.8.2.1. Kratkotrajna stanična kultura krvotvornih matičnih stanica***

Krvotvorne prastanice usmjerene u granulocitne (CFU-GM), eritroidne (BFU-E) ili primitivnije mješovite granulocitno/eritroidne prastanice (CFU-GEMM, CFU-Mix) mogu se identificirati primjenom različitih tehnika staničnih kultura. Budući da broj CFU-GM kolonija dobro korelira s brojem BFU-E u većini kliničkih istraživanja zbog jednostavnosti se obično izvještava samo o broju CFU-GM kolonija. Kod staničnih kultura javlja se problem standardizacije jer vrsta medija i reagensa koji se koriste za kulturu stanica mogu utjecati na učinkovitost uzgoja. Drugo veliko ograničenje metode je što su rezultati kratkotrajnog uzgoja kulture stanica dostupni tek nakon 14 dana. Stoga se ovaj test ne može primjeniti za dnevnu evaluaciju rezultata sakupljanja. Izračunavanje sadržaja krvotvornih prastanica u produktu je jednostavno: množi se broj kolonija s brojem stanica u produktu i podijeli s brojem inicijalno zasađenih stanica.<sup>75</sup>

#### ***1.8.2.2. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom***

Biljeg CD34 izražen je na 1-3% mononuklearnih stanica koštane srži i te stanice pokazuju sposobnost obnove svih krvnih loza *in vitro* i *in vivo*. Dokazano

je da se unutar odjeljka CD34+ stanica u ljudi nalaze primitivne krvotvorne matične stanice, pa se ovaj biljeg danas koristi u procjeni kvalitete produkta leukaferenze.

Pri analizi biljega CD34 javlja se manje varijacija nego kod *in vitro* kultura krvotvornih prastanica. Tehnika je jednostavna, a koriste se komercijalni reagensi. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog.<sup>76</sup> Protočni sustav čine pokretačka tekućina koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica – veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5 do 10°, FSC – prema engl. *forward scatter*) i znatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom – SSC, prema engl. *side scatter*). Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili češće za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (*fluorokromima*) rabi se za obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični detektori protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i znatosti stanica (FSCxSSC) na kojem se postavlja regija analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da stanice prije analize nije potrebno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu mjerenja signala (>10<sup>3</sup> stanica u sekundi) te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala), pa se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do desetak parametara.



Mjerenje broja CD34+ KMS u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije KMS je samo jedna od metoda imunofenotipskih analiza koje se danas koriste na protočnom citometru. Prednosti određivanja broja CD34+ stanica u krvi protočnom citometrijom su brzina dobivanja rezultata (mjerenje se može izvršiti unutar jednog sata), osjetljivost (analiza do 500000 stanica u nekoliko minuta) i reproducibilnost.<sup>76</sup> Danas se primjenjuju dvije metode pri čemu se jedna oslanja na udio CD34+ stanica u leukocitima i podatke o broju leukocita s hematološkog brojača (*engl. double-platform*),<sup>77</sup> dok najnovija metodologija zahtijeva izračunavanje svih vrijednosti na samom protočnom citometru za što se koriste posebne baždarne kuglice (*engl. single-platform*).<sup>78</sup> Rezultat se izražava kao postotak CD34+ stanica u određenim leukocitnim odjeljcima periferne krvi ili produktu leukaferoze, a najvažniji podatak jest postotak CD34+ stanica na ukupan broj leukocita.

Dokazana je korelacija između broja CD34+ stanica i CFU-GM kolonija u ispitivanom uzorku.<sup>75</sup> Stoga se smatra da analiza CD34+ stanica daje slične podatke kao i stanična kultura, osim što stanična kultura također dokazuje i vijabilnost KMS. Dobro je poznata linearna korelacija broja CD34+ stanica s oporavkom granulocita ili trombocita, ali i ovdje kao i kod broja CFU-GM kolonija čini se da postoji prag CD34+ stanica iznad kojeg se ne može povećati brzina oporavka. U transplantatu KMS sakupljenih aferezom za postizanje hematološkog oporavka treba biti minimalno  $2 \times 10^6$ /kg TT, dok je za optimalni oporavak potrebno  $5 \times 10^6$  CD34+ stanica/kg TT.<sup>59, 60</sup>

### 1.8.3. Ispitivanje vijabilnosti stanica

Vijabilnost stanica može se ispitati bojenjem tripanskim modrilom i protočnom citometrijom bojenjem propidijskim jodidom ili 7-amino-actinomycinom D (7-AAD). Međutim, mora se naglasiti da ove metode ne ispituju direktno sposobnost stanica da ponovno nasele koštanu srž. Mnogo prikladnija metoda određivanja vijabilnosti stanica je *in vitro* kultura krvotvornih prastanica čime se određuje klonogeni potencijal, točnija mjera vijabilnosti udružena s brojanjem

CD34+ stanica. Ispitivanje vijabilnosti stanica sakupljenih leukaferozom u pravilu je pokazalo visok udio vijabilnih stanica, i to u prosjeku  $97,7 \pm 1,4\%$ .<sup>79</sup>

#### **1.8.4. Mikrobiološka analiza produkta leukaferoze**

Dobra laboratorijska praksa nalaže da svaki laboratorij ima organiziran program nadzora reagensa i tehnika sakupljanja te obrade produkta s ciljem otkrivanja odstupanja od aseptičnih tehnika i sprečavanja mikrobiološke kontaminacije. Važeći standardi i preporuke zahtijevaju provođenje bakterijske i mikološke kulture pripravka KMS kako nakon sakupljanja tako i nakon obrade.<sup>73, 80</sup> Za analizu mikrobiološke kontaminacije uzima se mali volumen produkta, od 1 do 5 mL, ovisno o veličini produkta i tehnici kulture u mediju koji podupire aerobne i anaerobne bakterije te gljivice. Jedan od izvora mikrobiološke kontaminacije može biti kateter za aferezu koji se može inficirati tijekom upotrebe, obično s florom kože. Druga je mogućnost da se tijekom leukaferoze sakupi i mikroorganizam koji se već nalazi u krvi bolesnika. Ako je bolesnik febrilan tijekom leukaferoze obavezno je uz hemokulturu produkta afereze učiniti i hemokulturu bolesnikove krvi.

Mikrobiološki kontaminirani produkti ne moraju obavezno biti uništeni, jer je poznato da infuzija kontaminiranog produkta ne uzrokuje uvijek infekciju u primatelja.<sup>81</sup> Odluku o postupku s mikrobiološki kontaminiranim produktom donosi bolesnikov liječnik nakon razmatranja vrste uzročnika i potencijalne koristi i rizika primjene kontraminiranog produkta.

#### **1.8.5. Analiza kontaminacije tumorskim stanicama**

Metode za određivanje tumorske kontaminacije produkta leukaferoze trebale bi otkriti razinu kontaminacije od 1 tumorske stanice na  $10^3$  do  $10^5$  normalnih stanica ili manje. Ako su dostupne molekularne probe za jedinstvene DNA slijedove tumorskih stanica, metoda polimeraze lančane reakcije (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) može otkriti izuzetno mali broj malignih stanica.<sup>82</sup>

Već dugi niz godina, sporno je pitanje doprinose li maligne stanice u transplantatu relapsu nakon autologne transplantacije. Ovo pitanje je osobito

važno za bolesti koštane srži kao što su akutne leukemije. Naime, ako su leukemijske stanice prisutne u vrijeme leukaferoze, za očekivati je da i te stanice mogu biti sakupljene i zamrznute. Upravo su iz tog razloga neki transplantacijski centri posvetili značajne napore u razvitak metoda uklanjanja ili «čišćenja» malignih stanica iz transplantata koštane srži. Istraživanje Brennera i sur. je pokazalo da minimalna ostatna bolest u transplantatu koštane srži može doprinjeti relapsu nakon transplantacije u bolesnika s akutnom mijeloidnom leukemijom.<sup>83</sup> Iako se čini da maligne stanice koje se nalaze u transplantatu koštane srži mogu doprinjeti relapsu nakon transplantacije kod bolesnika s akutnom mijeloidnom leukemijom i možda kod ne-Hodgkinovog limfoma isto se ne može zaključiti za transplantaciju KMS sakupljenih iz periferne krvi.<sup>83, 84</sup>

Smatra se da bi transplantat KMS sakupljen iz periferne krvi mogao sadržavati manji broj malignih stanica od transplantata koštane srži. Međutim, maligne stanice su nađene u perifernoj krvi bolesnika s neuroblastomom i tumorom dojke, a u nekih od njih broj malignih stanica u perifernoj krvi čak je i veći od broja u koštanoj srži.<sup>82, 85</sup> U bolesnika sa solidnim tumorom dojke i pluća u kojih su KMS mobilizirane kemoterapijom i G-CSF-om, uz KMS su u krv mobilizirane i tumorske stanice.<sup>86</sup> Važnost ovog nalaza za ishod transplantacije KMS iz periferne krvi još nije razjašnjena. Nalaz povećanog broja monoklonskih plazma stanica u produktu leukaferoze u bolesnika s multiplim mijelomom povezan je s kraćim preživljenjem nakon transplantacije.<sup>87</sup> Ovaj nalaz ne znači da su plazma-stanice u produktu leukaferoze odgovorne za relaps bolesti, ali ipak usmjerava pozornost na pažljivo planiranje početka sakupljanja KMS s obzirom na stadij bolesti.

### **1.9. Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica u djece**

U djece se postupkom leukaferoze mogu uspješno sakupiti KMS, ali pri tome valja obratiti pozornost na mogućnost pojave poteškoća uzrokovanih pronalaženjem odgovarajućeg venskog pristupa, hemodinamskim poremećajem uslijed velikog volumena krvi djeteta u izvantjelesnoj cirkulaciji, metaboličkim

promjenama uzrokovanim antikoagulantnom otopinom i suradnjom djeteta tijekom postupka koji traje više sati.<sup>88</sup>

Za uspješno sakupljanje KMS neophodno je osigurati dobar protok krvi kroz stanični separator. Budući da su u djece krvne žile manjeg promjera, ovisno o veličini djeteta moraju se koristiti i različite vrste centralnih venskih katetera. Ako zbog veličine djeteta nije moguće postaviti dvoluminalni, tada jedoluminalne katetere odgovarajućeg promjera treba postaviti u dvije različite vene: npr. jedan u venu subklaviju, a drugi u femoralnu venu.

Jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika za leukaferazu u djece je njihov mali ukupan volumen krvi.<sup>88</sup> Ovisno o vrsti staničnog separatora, u izvantjelesnoj cirkulaciji se tijekom leukaferaze nalazi od 180 do 370 ml krvi bolesnika, a to može iznositi čak i do 40% ukupnog volumena krvi djeteta. Pomak bolesnikove krvi u izvantjelesnu cirkulaciju veći od 10% do 15% ukupnog volumena krvi uzrokuje hipovolemiju, hemodiluciju i hemodinamske promjene koje se mogu očitovati bljedoćom i znojenjem, hipotenzijom, tahikardijom pa čak i hipovolemičkim šokom. Hipovolemija i hemodilucija u djece može se spriječiti ako se set za sakupljanje staničnog separatora prije početka leukaferaze ispuni imunohematološki podudarnim ozračenim koncentratom eritrocita sa smanjenim brojem leukocita. Ovaj postupak je obavezan u sve djece tjelesne težine manje od 25 kg, a neki ga autori preporučuju uvijek kada je izvantjelesni volumen krvi veći od 15%.<sup>88</sup>

Metaboličke promjene uzrokovane infuzijom citrata su u djece obično izraženije nego u odraslih jer djeca imaju manji kapacitet metaboliziranja citrata u jetri pa se mogu češće javiti simptomi hipokalcemije. Blaži klinički simptomi hipokalcemije u djece su nespecifični i često se prepoznaju tek kad dođe do pogoršanja. Primjena citrata kao antikoagulansa u djece zahtijeva osobito pažljiv nadzor tijekom leukaferaze kako bi se na vrijeme prepoznali već i nespecifični simptomi kao što su bol u truhu i znojenje ili pak teži, kao što su poremećaj srčanog ritma ili hipotenzija.<sup>88</sup> Stoga je u djece tijekom leukaferaze obavezna profilaktička primjena kontinuirane infuzije kalcija.

Dugotrajan postupak sakupljanja KMS iz krvi jest stresna situacija kako za dijete tako i za njegove roditelje. Roditeljima treba detaljno razjasniti postupak sakupljanja i omogućiti im boravak uz dijete tijekom leukaferenze jer će se na taj način smanjiti njihova zabrinutost, a time i stres djeteta. Iako se zbog svega navedenoga u djece može očekivati veći broj neželjenih reakcija nego u odraslih, većina njih se može spriječiti individualnim prilagođavanjem tehnike sakupljanja svakom djetetu.

#### 1.10. Leukaferenza velikog volumena krvi

Sakupljanje dovoljnog broja stanica za transplantaciju ponekad je otežano zbog toga što bolesnici nisu mobilizirali dovoljan broj CD34+ stanica u krv. Primjena novih agenasa za mobilizaciju, unaprijeđenje tehnologije sakupljanja, kao i sakupljanje transplantata u ranijoj fazi liječenja bolesti može smanjiti broj potrebnih postupaka leukaferenze. Drugi način za povećanje prinosa KMS može biti povećanje volumena krvi koji se obrađuje tijekom leukaferenze. Važan razlog za obradu većeg volumena krvi u jednoj leukaferenzi je taj što je učinak mobilizacije prolazan i CD34+ stanice se u krvi nalaze u maksimalnoj koncentraciji samo kratko vrijeme. Stoga se to vrijeme mora maksimalno iskoristiti jer se u protivnom može propustiti optimalno vrijeme za sakupljanje. Glavna zamjerka obradi većeg volumena krvi je što može izazvati veći broj neželjenih reakcija kao što su simptomi hipokalcemije zbog primjene većeg volumena antikoagulanasa, trombocitopenija te anemija.

Standardno se ukupan volumen bolesnikove krvi obrađuje 2 do 3 puta, što iznosi od 8 do 12 L, a postupak je ograničen na fiksno vremensko razdoblje od 3 do 4 sata. Leukaferenzom velikog volumena krvi (LVV, *engl. large volume leukapheresis*) ukupan volumen krvi bolesnika se obradi više od 3 puta, pa čak do 6 puta. Obrada većeg volumena krvi u jednom postupku leukaferenze može se postići na dva načina: produženjem trajanja postupka leukaferenze ili pak povećanjem brzine ulaznog protoka krvi u stanični separator. Pri produženju trajanja leukaferenze u obzir valja uzeti koliko je bolesnik sposoban podnijeti

dugotrajan postupak leukaferenze. Tehničko unapređenje staničnih separatora omogućilo je povećanje brzine ulaznog protoka krvi, a time i obradu većeg volumena krvi darivatelja u kraćem vremenskom razdoblju. Budući da se zbog sprječavanja zgrušavanja tijekom leukaferenze obrađenoj krvi mora u odgovarajućem omjeru dodati antikoagulantna otopina ACD, povećanje protoka krvi kroz stanični separator i obrada većeg volumena zahtijeva da bolesnik primi i proporcionalno veći volumen antikoagulantne otopine što povećava rizik nastanka hipokalcemije. Volumen antikoagulansa potreban za sprječavanje zgrušavanja može se smanjiti ako se uz ACD primjeni i heparin.<sup>89-91</sup> Heparin je siguran antikoagulans koji se već niz godina koristi kao sredstvo za sprječavanje zgrušavanja u aparatima za izvantjelesnu cirkulaciju. Dodavanje heparina u otopinu ACD u omjeru 6 i.j. heparina na 1 mL ACD-A, omogućuje povećanje omjera ACD i pune krvi sa standardnih 1:12 na 1:24 i dvostruko povećanje brzine ulaznog protoka krvi. Udvostručenje brzine ulaznog protoka krvi u separator omogućuje obradu dvostruko većeg volumena krvi u istom vremenskom razdoblju.

Ukupan volumen krvi može biti obrađen 4, 5 ili čak 6 puta i kretati se u rasponu od 12 do 25 L.<sup>67</sup> Neki autori obrađuju čak do 35 L krvi bolesnika dok drugi obradu tek 10 L krvi smatraju velikim volumenom.<sup>92, 93</sup> Budući da nije točno određeno koji se volumen obrađene krvi definira kao LVV, otežana je i usporedba rezultata istraživanja objavljenih o LVV.

Više istraživanja je uspoređivalo rezultate obrade standardnog volumena u odnosu na veliki volumen krvi. Humpe i sur.<sup>90</sup> proveli su prospektivno randomizirano istraživanje u 26 bolesnika s tumorom dojke i 15 bolesnika s ne-Hodgkinovim limfomom. Bolesnici su randomizirani i jednoj skupini je prvi dan učinjena standardna leukaferenza u kojoj je ukupan volumen krvi obrađen 2,5 puta, a drugi dan je učinjena LVV tijekom koje je krv obrađena 4,6 puta. U drugoj skupini je prvo učinjena LVV, a potom standardna leukaferenza. Prinos CD34+ stanica i CFU-GM-a je bio značajno veći nakon primjene LVV nego nakon standardne leukaferenze. Gasova i sur.<sup>94</sup> su pokazali da je prinos CD34+ stanica

veći u produktu sakupljenom LVV-om tijekom obrade 4 volumena krvi u odnosu na standardna 2 volumena. Retrospektivno istraživanje provedeno u našoj ustanovi uspoređivalo je prinos mononuklearnih i CD34+ stanica između skupine od 165 bolesnika u kojih je ukupan volumen krvi obrađen dva puta i skupine od 155 bolesnika u kojih je ukupan volumen krvi obrađen 4 puta postupkom LVV.<sup>95</sup> Postupkom LVV dobiven je statistički značajno veći prinos mononuklearnih i CD34+ stanica.

Već su prva istraživanja sakupljanja KMS iz periferne krvi postupkom afereze provedena na životinjama pokazala važnost volumena obrađene krvi na broj sakupljenih stanica. Bolin i sur. su još 1983. godine pokazali da se obradom velikog volumena krvi u pasa mogu mobilizirati CFU-GM u krv, te da je prinos CFU-GM obradom svakog slijedećeg volumena krvi sve veći.<sup>96</sup>

O LVV su prvi puta 1991 godine izvjestili Hillyer i sur. koji su analizirali produkt afereze sakupljen od 4 zdrava dobrovoljaca bez mobilizacije.<sup>92</sup> Prinos mononuklearnih stanica u 4 vrećice je bio bez promjena, dok je prinos CFU-GM bio 1,26, 1,86 i 2,52 puta veći u odnosu na prvu vrećicu. Hillyer i sur. su u drugom istraživanju analizirali afereze učinjene uz maksimalni protok krvi na CS3000 Plus separatoru u 13 zdravih nemobiliziranih dobrovoljaca kojima su tijekom 4 sata obrađena približno 3 ukupna volumena krvi.<sup>97</sup> Nađen je dvostruki porast prinosa kako CD34+ stanica, tako i CFU-GM-a tijekom 4 sata sakupljanja. U pripravku leukaferoze su našli velik broj limfocita što je dobro poznato da negativno utječe na ishod transplantacije alogenih KMS iz periferne krvi. Ova skupina autora je izvjestila i o sličnim rezultatima u bolesnika s hematološkim malignim bolestima.<sup>93</sup> Analizirali su prinos CFU-GM u 4 onkološka bolesnika nakon kemoterapije. Produkt leukaferoze su sakupljali uzastopno u četiri vrećice tijekom obrade četiri volumena krvi i četvrti sat su zabilježili 1,8 puta povećan prinos CFU-GM u odnosu na prvi sat.

Poznato je da tijekom leukaferoze dolazi do promjene broja CD34+ stanica u krvi, međutim rezultati dosadašnjih istraživanja su proturječni. Passos Coelho i sur.<sup>98</sup> su nakon leukaferoze koja je trajala 6 sati našli smanjenje broja

CD34+ stanica u krvi za 75%, dok je prinos CD34+ bio bez promjene. Murea i sur. su također pratili broj CD34+ stanica u perifernoj krvi tijekom obrade 20 L krvi.<sup>89</sup> Broj CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u krvi se na početku obrade smanjio, da bi se na kraju LVV vratio na početne vrijednosti uz dodatni blagi porast 2 sata nakon leukaferoze. Nisu našli razliku u subpopulacijama CD34+ stanica sakupljenim u dvije vrećice.

Cassens i sur. su analizirali samo produkt leukaferoze sakupljen u 6 vrećica tijekom obrade 4 volumena krvi bolesnika.<sup>99</sup> Postotak CD34+ stanica u produktu ostao je konstantan tijekom prve tri vrećice, a potom se postepeno smanjivao, od 1,71% CD34+ stanica na početku LVV do 1,34% CD34 stanica na kraju leukaferoze ( $p=0,02$ ). Humpe i sur.<sup>100</sup> su prospektivno pratili 18 bolesnika (od 41 iz gornjeg istraživanja) i tijekom obrade 4 volumena krvi postupkom LVV evalulirali kinetiku broja CD34+ stanica u perifernoj krvi i u cijevi seta za sakupljanje staničnog separatora. Broj CD34+ stanica u perifernoj krvi se nakon obrade jednog volumena smanjio na 64% početne vrijednosti, a na kraju postupka je u krvi ostalo 41% stanica od početne vrijednosti. Kumulativni prinos stanica u produktu leukaferoze je konstantno rastao. Bojko i sur. su dodatno obradili peti put volumen krvi i našli za 10% veći prinos CD34+ stanica u odnosu na prethodna 4 volumena, iako se broj CD34+ stanica u krvi tijekom LVV smanjio.<sup>101</sup>

Moler i sur.<sup>102</sup> su u 7 bolesnika prikupljali KMS standardnim postupkom uz omjer pune krvi i citrata 1:13, dok je u drugih 7 bolesnika učinjena LVV s heparinom uz omjer 1:26 uz visok ulazni protok (koji se nije mogao uspostaviti kod čak 3 bolesnika). Murea i sur.<sup>89</sup> su analizirali učinkovitost LVV i prinos CD34+ stanica u bolesnika mobiliziranih s kemoterapijom i G-CSF-om. Našli su da je prinos CD34+ stanica po kg TT dvostruko veći kod LVV nego u standardnoj leukaferozu. Oni su našli da se tijekom LVV u 74% bolesnika može sakupiti više od  $2,5 \times 10^6/kg$ . Kad se izvodi standardna leukaferoza, tek se u 25% bolesnika sakupi toliki broj stanica. Monacada i sur. su izvjestili da kod LVV prinos CD34+



stanica korelira s brojem CD34+ u perifernoj krvi prije afereze i kod dobrih i kod loših mobilizatora.<sup>103</sup>

Unatoč tome što je broj CD34+ stanica u krvi najvažniji prognostički činitelj, usješnosti sakupljanja i volumen krvi obrađen tijekom postupka se pokazao kao vrlo važan za ukupan prinos leukaferoze. U «loših» mobilizatora, Smolowicz i sur. nisu nakon obrade 16 L krvi našli korelaciju između broja CD34+ u perifernoj krvi i broja stanica sakupljenog leukaferozom.<sup>104</sup> Budući da su njihovo sljedeće istraživanje<sup>105</sup> pokazalo da broj sakupljenih stanica korelira s porastom volumena obrađene krvi oni predlažu LVV kao metodu izbora u bolesnika koji su «loši» mobilizatori jer se mali broj CD34+ stanica u krvi može kompenzirati produženjem trajanja postupka i povećanjem volumena obrađene krvi.

Ista skupina autora također je pokazala da tijekom leukaferoze dolazi do većeg prinosa CD34+ stanica nego se to može očekivati s obzirom na broj prisutan u krvi prije početka leukaferoze.<sup>104, 105</sup> Veći prinos KMS od očekivanog je objašnjen dodatnom mobilizacijom KMS iz koštane srži tijekom afereze.

Još uvijek nije razjašnjeno uzrokuje li sam postupak leukaferoze dodatno otpuštanje KMS u krv.<sup>93</sup> Proturječni podaci koji se nalaze u literaturi o dodatnom otpuštanju CD34+ u krv zbog leukaferoze mogu se objasniti različitim liječenjem i planovima istraživanja. Štoviše, u nekim istraživanjima KMS su mobilizirane samo G-CSF-om, a u drugima kombinacijom kemoterapije i G-CSF-a. Osim toga niti volumen krvi obrađen tijekom leukaferoze nije uvijek bio prilagođen ukupnom volumenu krvi bolesnika te stoga rezultati nisu usporedivi.

#### **1.10.1. Leukaferoze velikog volumena krvi u djece**

LVV se uspješno primjenjuje i u djece. Gorlin i sur. su u sedmero djece analizirali 20 postupaka LVV koji su trajali 4 sata.<sup>91</sup> U grupi djece starije od 5 godina tjelesne težine od 22 do 59 kg u kojih je obrađeno 6 volumena krvi pokazalo se da dolazi do povećanog otpuštanja KMS tijekom leukaferoze, ali ne i u djece mlađe od 5 godina tjelesne težine od 13 do 17,5 kg.

Yamaguchi i sur. su u petero djece mobiliziranih kemoterapijom i G-CSF-om sakupljali KMS postupkom LVV.<sup>106</sup> Sakupljeno je više mononuklearnih, CD34+ stanica i CFU-GM nego tijekom obrade standardnog volumena krvi. Njihovi bolesnici su imali više neželjenih reakcija zbog LVV, uključujući značajnu trombocitopeniju. Za razliku od djece, u troje odraslih bolesnika iz istog istraživanja, s porastom volumena obrađene krvi došlo je do porasta broja CFU-GM-a. Njihovi rezultati upućuju da je dinamika sakupljanja KMS u djece različita od one u odraslih. U pedijatrijskih bolesnika nakon leukaferoze gotovo nije bilo smanjenja broja mononuklearnih i CD34+ stanica u perifernoj krvi, dok je u odraslih nakon leukaferoze broj mononuklearnih stanica smanjen za 42%, a CD34+ stanica za 44%. Isti autori su pokazali i da se učinkovitost separatora u sakupljanju stanica ne smanjuje tijekom leukaferoze što je viđeno i u drugim istraživanjima u odraslih bolesnika.<sup>92, 93, 96, 97, 107, 108</sup> Smanjenje broja trombocita, hemoglobina i trombocita u perifernoj krvi su izraženije u djece nego u odraslih, što je vjerojatno posljedica primjenjene velike količine antikoagulansa u odnosu na njihov mali ukupni volumen krvi. Cecyn i sur. su izvijestili o LVV u djece male tjelesne težine.<sup>109</sup> Našli su da je LVV u male djece sigurna i učinkovita procedura te istaknuli da treba obratiti pozornost na rizik pojave trombocitopenije.

#### **1.10.2. Nuspojave leukaferoze velikog volumena krvi**

Povećanje brzine ulaznog protoka krvi u stanični separator omogućuje obradu velikog volumena krvi, ali zahtijeva i veću potrošnju antikoagulantne otopine te dodatnu primjenu heparina. Primjena veće količine citratne antikoagulantne otopine povećava učestalost reakcija na citrat i do 33%.<sup>110</sup> Više autora je izvjestilo o padu broja trombocita nakon LVV.<sup>111, 112</sup> Stupanj smanjenja broja trombocita ovisio je o obrađenom volumenu krvi kao i početnim vrijednostima trombocita. Pojava trombocitopenije nakon LVV se mora uzeti u obzir pri razmatranju primjene dva antikoagulansa i činjenici da većina bolesnika zbog potreba leukaferoze ima veliki centralni venski kateter.<sup>101</sup> Uz to, mora se uzeti u obzir i učinak LVV-a na elektrolite u serumu i pokazatelje koagulacije. Humpe i sur. su pokazali da tijekom LVV-a dolazi do značajnog smanjenja

vrijednosti kalcija i kalija te značajnog produženja APTV.<sup>111</sup> Stoga se tijekom LVV-a preporučuje praćenje ovih pokazatelja, a u slučaju nižih vrijednosti treba razmotriti nadoknadu trombocita i elektrolita.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Pretpostavka je da se postupkom leukaferenze velikog volumena krvi (LVV) u usporedbi sa standardnim postupkom može sakupiti veći broj CD34+ stanica, iako mehanizam otpuštanja matičnih stanica u perifernu krv i pretpostavljen fenomen dodatnog novačenja KMS-a tijekom leukaferenze nije istražen.<sup>79, 98, 100, 113</sup> U skladu s tim, svrha ovog rada je pokazati da se jednim postupkom leukaferenze velikog volumena krvi uz prihvatljivu učestalost nuspojava može prikupiti dovoljan broj krvotvornih matičnih stanica. Time bi se izbjeglo nepotrebno izlaganje bolesnika rizicima višekratnih leukaferenza, smanjili troškovi i omogućilo planiranje rada jedinice za aferezu.

Specifični ciljevi istraživanja su slijedeći:

1. Pratiti dinamiku promjene broja CD34+ stanica u perifernoj krvi tijekom LVV i ispitati da li produženjem trajanja leukaferenze dolazi do iscrpljenja ili porasta broja CD34+ stanica u perifernoj krvi;
2. Pratiti dinamiku promjene broja i subpopulacija CD34+ stanica u produktu leukaferenze s obzirom na trajanje postupka;
3. Ispitati učinkovitost sakupljanja i ukupan prinos CD34+ stanica u produktu prikupljenom tijekom LVV;
4. Ispitati utječe li na učinkovitost sakupljanja i prinos CD34+ stanica stupanj mobilizacije CD34+ stanica u krv prije leukaferenze i dijagnoza bolesnika;
5. Ispitati da li se tijekom obrade 4, odnosno 6 ukupna volumena krvi mijenjaju subpopulacije CD34+ stanica koje istodobno izražavaju jedan od biljega: CD38, HLA-DR, CD90/Thy-1, CD117/c-kit, CD33 i CD41 u korist nezrelijih oblika KMS;
6. Ispitati sigurnost postupka LVV prateći promjene broja drugih krvnih stanica (trombocita, eritrocita), razine elektrolita u serumu i koagulacijskih pokazatelja te kliničko značenje opaženih laboratorijski promjena.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na skupini od 30 bolesnika s hematološkim zloćudnim bolestima koji su liječeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb u razdoblju od 2002. do 2007. godine. U tih je bolesnika tijekom liječenja predviđena transplantacija autolognim KMS, zbog čega je u Zavodu za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju KBC Zagreb učinjeno sakupljanje autolognih KMS iz periferne krvi postupkom leukaferenze. Obilježja bolesnika prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Obilježja bolesnika

Bolesnici (N)	30	
Spol (muškarci/žene)	16/14	
Dijagnoza (N)		
Multipli mijelom	20	
Ne-Hodgkinov limfom	8	
Hodgkinov limfom	2	
	<i>x ± SD*</i>	<i>raspon</i>
Dob (god)	50,13 ± 10,89	19 -61
Tjelesna težina (kg)	78,33 ± 15,46	57 - 108
Volumen krvi bolesnika (mL)	4618,57 ± 140,49	3463 - 6761

\**x ± SD*= aritmetička sredina ± standardna devijacija

U prethodnom liječenju bolesnici s multiplim mijelomom stadija II ili III su kao uvodnu terapiju primili 3 do 6 (medijan 5) ciklusa VAD kemoterapije (vinkristin, adriamicin, deksametazon).<sup>114</sup> U bolesnika s multiplim mijelomom je nakon sakupljanja odgovarajućeg transplantata planirana dvostruka transplantacija autolognih KMS. Bolesnici s ne-Hodgkinovim limfomom u parcijalnoj ili kompletnoj remisiji su prethodno liječeni s 4 do 11 (medijan 8) ciklusa CHOP kemoterapije (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednison).<sup>115</sup> Jedna bolesnica s ne-Hodgkinovim limfomom u drugoj kompletnoj remisiji primila

je 9 ciklusa COPP/ABV kemoterapije (ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednison, adriamicin, bleomicin, vinblastin),<sup>116</sup> a drugi bolesnik s Hodgkinovim limfomom 4 ciklusa ABVD kemoterapije (doksorubicin, bleomicin, vinblastin, dakarbazin)<sup>117</sup>. Za sve bolesnike s limfomom je nakon sakupljanja odgovarajućeg transplantata planirano liječenje visokim dozama kemoterapije uz transplantaciju autolognih KMS.

### **3.1.1. Pristanak za sudjelovanje u ispitivanju**

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Ur. broj: 01-75/48-1-2001), a svi su bolesnici potpisali obavješteni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica u perifernu krv**

U svih bolesnika mobilizacija KMS-a u perifernu krv potaknuta je primjenom kombinacije različitih citostatika uz granulocitni činitelj stimulacije rasta kolonija (engl. granulocyte – colony stimulating factor, G-CSF). Vrsta kemoterapije kojom su mobilizirane KMS ovisila je o vrsti bolesti. U svih bolesnika s multiplim mijelomom, a nakon postizanja parcijalne remisije, za mobilizaciju KMS primjenjen je ciklofosfamid u dozi od 4 g/m<sup>2</sup> i G-CSF u dozi od 10 µg/kg/dan. Za mobilizaciju KMS u bolesnika s limfomom korištena je različita kemoterapija i G-CSF: visoke doze ifosfamida i mitoksantrona (HDIM) (N= 7), idarubicin, citozin-arabinozid i etopozid (ICE) (N=1), BCNU, etopozid, citarabine i melfalan (mini BEAM) (N=1) te deksametazon, citarabin i cisplatin (DHAP) (N=1).<sup>116, 117</sup> Granulocitni činitelj stimulacije rasta (Neupogen, Roche, Švicarska) u dozi od 10 µg/kg tjelesne težine primjenjivan je supkutano 2 puta i to započevši od šestog dana nakon početka kemoterapije.

### **3.2.2. Kriteriji za ocjenu stupnja mobilizacije CD34+ stanica: «dobri» vs. «loši» mobilizatori**

Da bi se ispitala povezanost stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv s dinamikom promjene prinosa CD34+ stanica, bolesnici su podijeljeni na „loše“ i „dobre“ mobilizatore. „Loši“ mobilizatori su oni bolesnici u kojih maksimalna koncentracija CD34+ stanica u perifernoj krvi nakon mobilizacije nije dosegla 20x10<sup>6</sup>/L, a „dobri“ mobilizatori kod kojih je broj CD34+ stanica bio veći od 20x10<sup>6</sup>/L.

### **3.2.3. Kriteriji za početak sakupljanja krvotvornih matičnih stanica**

Tijekom mobilizacije su svim bolesnicima u perifernoj krvi praćene vrijednosti leukocita, CD34+ stanica i trombocita. Sam postupak leukaferenze je započeo kada je u perifernoj krvi broj leukocita bio veći od 1x10<sup>9</sup>/L, broj CD34+ stanica veći od 10x10<sup>6</sup>/L i broj trombocita veći od 30x10<sup>9</sup>/L.

### **3.2.4. Venski pristup**

Venski pristup ostvaren je kod svih bolesnika putem dvoluminalnog centralnog venskog katetera veličine 12 Fr (Dualise-Cath, Vygon, Francuska). Kateter je postavljen kod 27 bolesnika u venu subklaviju, kod 2 u jugularnu venu, a kod jednog u femoralnu venu.

### **3.2.5. Postupak sakupljanja krvotvornih matičnih stanica**

Za sakupljanje KMS-a korišten je stanični separator (COBE Spectra: Version 6.0, Gambro BCT, Lakewood, SAD) s programom za sakupljanje mononuklearnih stanica periferne krvi (MNC procedure). Ekstrakorporalni volumen ovog staničnog separatora iznosi 284 mL.

Za razliku od standardnih leukaferaza tijekom kojih se ukupni volumen krvi obradi 2 do 3 puta, u ovom su istraživanju učinjene leukaferaze velikog volumena krvi (LVL), što znači da je ukupni volumen krvi bolesnika obrađen 6 puta. Vrijednost ukupnog volumena krvi je za svakog bolesnika izračunata prema algoritmu programa staničnog separatora koji u obzir uzima visinu, težinu i spol bolesnika. Ulazni protok krvi u separator određen je automatski ovisno o težini i visini bolesnika.

Za sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom leukaferaze korišten je antikoagulans ACD-A (acidi citrici, dekstroza, formula A, HZTM, Hrvatska) u kombinaciji s heparinom (Heparin injekcije, Belupo, Hrvatska). Brzina infuzije antikoagulantne otopine bila je 0,8 mL/minuti po litri ukupnog volumena krvi bolesnika. Heparin je dodan antikoagulantnoj otopini u dozi 6 i.j./mL ACD-A. Primjena heparina je omogućila povećanje omjera ACD-citrata i pune krvi na 1:24 i stoga je povećana brzina ulaznog protoka krvi. Povećanje brzine ulaznog protoka krvi u separator omogućilo je obradu većeg volumena krvi u kraćem vremenskom razdoblju uz smanjenje količine infundiranog citrata.

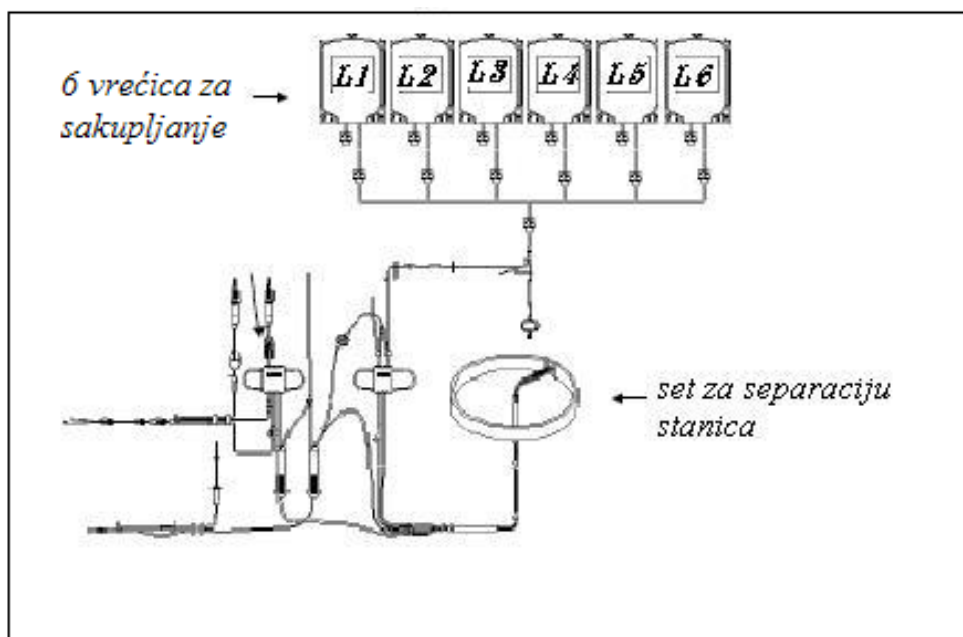
Sve leukaferaze nadzirao je isti operater. Produkt je u svih bolesnika sakupljan brzinom 1 mL/min. Promjenom brzine rada pumpe za plazmu održavan je hematokrit sakupljene frakcije stanica na približno 1% uz korištenje



kolorograma (WBC Colourgram, Gambro BCT, SAD) za vizualnu usporedbu boje u cjevčici za sakupljanje staničnog separatora.

Nakon obrade svakog volumena krvi redovito su bilježeni slijedeći pokazatelji: ulazni protok krvi (mL/min), trajanje postupka (min), potrošnja ACD-a (mL) i heparina (i. j.) te volumen obrađene krvi (mL).

Zbog analize kinetike sakupljanja KMS-a iz periferne krvi tijekom leukaferenze, zamijenjena je standardna vrećica za produkt leukaferenze seta za sakupljanje leukocita (WBC set Cat. No 70600) sistemom od 6 vrećica za sakupljanje krvi koje su pomoću aparata za sterilno spajanje spojene s linijom za sakupljanje. Na slici 4. shematski je prikazan modificiran set za sakupljanje KMS-a iz periferne krvi.



Slika 4. Shematski prikaz modificiranog seta za sakupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi

Cilj je bio 6 puta obraditi bolesnikov ukupni volumen krvi, a produkt leukaferenze tijekom obrade svakog volumena krvi sakupiti u zasebnu vrećicu. Kad je postignut željeni hematokrit stanične frakcije u cjevčici za sakupljanje (tj. optimalna boja produkta u cjevčici za sakupljanje) otvorena je prva vrećica u koju

je sakupljen produkt leukaferenze tijekom obrade jednog ukupnog volumena bolesnikove krvi. U slijedeće su vrećice redom sakupljeni produkti leukaferenze sakupljeni tijekom 2., 3., 4., 5. i 6. obrade ukupnog volumena krvi bolesnika. Vrećice su označene s oznakama *L1, L2, L3, L4, L5 i L6*.

### **3.2.6. Kriteriji uspješnosti sakupljanja**

Cilj je bio sakupiti najmanje  $3,5 \times 10^6/\text{kg}$  TT, a optimalno  $5 \times 10^6/\text{kg}$  TT CD34+ stanica.

Za bolesnike u kojih je planirano liječenje dvostrukom transplantacijom, cilj je bio sakupiti dvostruku količinu stanica, tj. više od  $7 \times 10^6/\text{kg}$  TT CD34+ stanica.

### **3.2.7. Nuspojave leukaferenza**

Tijekom leukaferenze bolesnici su pažljivo praćeni. Posebna pozornost bila je usmjerena na pojavu neželjenih reakcija koje su klasificirane prema kriterijima National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0.<sup>118</sup> Ta klasifikacija razlikuje pet stupnjeva nuspojava pri čemu stupanj 1. označava blagu nuspojavu, stupanj 2. umjerenu nuspojavu, stupanj 3. tešku nuspojavu, stupanj 4. nuspojavu koja ugrožava život i stupanj 5. nuspojavu sa smrtnim ishodom. Prilikom planiranja istraživanja odlučeno je da će se postupak leukaferenze prekinuti ako se tijekom leukaferenze jave nuspojave 3., 4. ili 5. stupnja koje vitalno ugrožavaju bolesnika, a to su: a) teški simptomi hipokalcemije koji traju unatoč liječenju, b) problemi s venskim protokom zbog okluzije katetera i c) poremećaj koagulacije praćen krvarenjem na mjestu uvođenja katetera ili pojavom petehija.

Zbog prevencije pojave simptoma hipokalcemije koji bi mogli nastati zbog primjene antikoagulantne otopine sa citratom, svi bolesnici su tijekom leukaferenze intravenski primali kontinuiranu infuziju  $0,5 \text{ g}$  kalcij klorida/ $10 \text{ kg}$  TT u  $100 \text{ mL}$  fiziološke otopine.

### **3.2.8. Praćenje promjena broja krvnih stanica u perifernoj krvi**

U uzorku periferne krvi bolesnika praćen je broj leukocita, mononuklearnih stanica, trombocita, hemoglobina i CD34+ stanica. Uzorci su uzimani neposredno prije početka sakupljanja i nakon obrade svakog ukupnog volumena krvi, tj. nakon 1., 2., 3., 4., 5. i 6. obrade ukupnog volumena bolesnikove krvi.

### **3.2.9. Kontrola kvalitete produkta leukaferoze**

Uzorci su uzeti iz svake vrećice u koju je prikupljen produkt tijekom 1., 2., 3., 4., 5. i 6. obrade ukupnog volumena krvi (L1, L2, L3, L4, L5 i L6). Nakon toga je sadržaj vrećica s produktom sakupljenim tijekom obrade prva četiri volumena krvi spojen («pooliran») u jednu vrećicu (UVK1234), što odgovara produktu koji bi bio prikupljen standardnom leukaferozom. U drugu vrećicu (UVK 56) je spojen sadržaj dvije vrećice u kojima je produkt prikupljen tijekom 5. i 6. obrade ukupnog volumena krvi. Uzorci su uzeti iz obje vrećice: prve s produktom leukaferoze sakupljenim standardnom leukaferozom (UVK1234) i druge u kojoj je bio produkt sakupljen tijekom dodatne 5. i 6. obrade ukupnog volumena krvi (UVK56). Na kraju je i sadržaj ove dvije vrećice spojen pa se u finalnoj vrećici (LVL) nalazio ukupan produkt leukaferoze

Iz svake vrećice je u sterilnim uvjetima uzet 1 mL produkta leukaferoze za laboratorijsku analizu tijekom koje je određen broj leukocita, mononuklearnih stanica i CD34 + stanica. U vrećici s produktom sakupljenim tijekom obrade prva 4 volumena krvi, kao i u vrećici s produktom prikupljenim tijekom obrade 5. i 6. volumena krvi dodatno su određene subpopulacije CD34+ stanica. Diferencijacijski status KMS i prastanica određen je analizom istodobnog izražavanja biljega CD38, CD90 ili HLA-DR, usmjerenje u mijeloidnu lozu biljega CD33 ili CD117/c-kit, a u megakariocitnu lozu biljega CD41. Shema uzimanja uzoraka za kontrolu kvalitete produkta leukaferoze prikazana je na slici 5. Zabilježen je točan volumen pripravka leukferoze u svakoj pojedinoj vrećici. Iz ukupnog produkta leukaferoze (LVL) uzeti su i uzorci za mikrobiološko ispitivanje sterilnosti pripravka.

<b>L1</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>	<b>L2</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>	<b>L3</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>	<b>L4</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>	<b>L5</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>	<b>L6</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice</i>
<b>UVK 1234</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, subpopulacije CD34+ stanica</i>				<b>UVK56</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, subpopulacije CD34+ stanica</i>	
<b>LVL</b> <i>leukociti, mononuklearne stanice, CD34+ stanice mikrobiološka analiza</i>					

*Slika 5. Shema uzimanja uzoraka za kontrolu kvalitete produkta leukaferoze (opis u tekstu)*

### **3.2.10. Laboratorijsko ispitivanje uzoraka periferne krvi i produkta leukaferoze**

#### **3.2.10.1. Određivanje broja krvnih stanica**

Broj krvnih stanica leukocita, eritrocita i trombocita, kao i hematokrit u perifernoj krvi i produktu leukaferoze određen je automatski hematološkim brojačem ADVIA 120 (Bayer, Leverkusen, Njemačka). Diferencijalna krvna slika određena je ručno koristeći metodu bojenja po Pappenheimu. U mononuklearne stanice su ubrojani monociti i limfociti.

#### **3.2.10.2. Određivanje brojnosti krvotvornih matičnih stanica**

##### **3.2.10.2.1. Određivanje broja CD34+ stanica**

Broj KMS-a u perifernoj krvi i produktu leukaferoze određen je mjerenjem postotka CD34+ stanica s pomoću protočne citometrije prema protokolu ISHAGE.<sup>77</sup> U tu svrhu rabljena su monoklonska protutijela anti-CD45-FITC (klon 2D1) i anti-CD34-PE (klon 8G12) (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka) i protočni citometri FACSCalibur i FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka).

Subpopulacije CD34+ stanica u produktu leukaferoze određene su protočnom citometrijom s pomoću uređaja FACSCalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, SAD) koristeći monoklonska protutijela CD34+, CD38+, HLA-

DR+, CD90+/Thy-1, CD117+/c-kit, CD41+ i CD33+ (sva navedena monoklonska protutijela su proizvod Becton-Dickinson, Mountain View, CA, SAD). Za analizu je korišten program Software CellQuest™ (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, SAD).

#### **3.2.10.2.2. *Kratkotrajni uzgoj stanica***

Broj stanica koje *in vitro* stvaraju kolonije granulocita i makrofaga (CFU-GM, prema engl. *colony-forming unit-granulocyte/macrophage*), a koje predstavljaju usmjerene krvotvorne prastanice navedenih loza, određen je metodom kratkotrajnog uzgoja stanica produkta leukaferoze u polučvrstom mediju rabeći komercijalni pripravak MethoCult H4433 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada).<sup>119</sup> Stanice su zasađene u polučvrsti medij u koncentraciji  $1 \times 10^5$  stanica s jezgrom/mL i inkubirane pri temperaturi 37°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Kolonije su brojane nakon 14 dana pod invertnim mikroskopom, a rezultat je izražen brojem kolonija na  $1 \times 10^5$  zasađenih stanica s jezgrom.

#### **3.2.10.3. *Praćenje vrijednosti elektrolita u serumu***

U uzorcima periferne krvi bolesnika izvađenim neposredno prije i nakon leukaferoze određene su vrijednosti elektrolita natrija, kalija, klorida, kalcija, magnezija i anorganskih fosfata. Te su vrijednosti analizirane biokemijskim analizatorom Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica, Tokyo, Japan). Natrij, kalij i kloridi analizirani su potenciometrijski, a kalcij, magnezij i anorganski fosfat spektrofotometrijski. Referentni interval za natrij je 137-146 mmol/L, kalij 3,9-5,1 mmol/L, magnezij 0,65-1,05 mmol/L, kloride 97-108 mmol/L, anorganski fosfat 0,79-1,42 mmol/L, a za kalcij 2,14-2,56 mmol/L.

#### **3.2.10.4. *Praćenje koagulacijskih pokazatelja***

Aktivirano tromboplastinsko vrijeme (APTV) i protrombinsko vrijeme (PV) mjereni su u uzorku citrirane krvi izvađenom neposredno prije i nakon leukaferoze. Vrijednosti APTV-a i PV-a analizirane su BCT koagulometrom (Siemens Medical Instruments, Köln, Njemačka). Referentni interval za APTV je 24,0-33,0 sekundi, a za PV 0,70-1,30.

### **3.2.10.5. Mikrobiološka analiza produkta leukaferenze**

Mikrobiološka analiza sterilnosti (aerobno i anaerobno bakteriološki te mikološki) ukupnog produkta leukaferenze (LVL) učinjena je aparatom za automatsku inkubaciju i detekciju pozitivnih primarno sterilnih uzoraka BacT/ALERT 3D (BioMerieux, Durham, SAD).

### **3.2.11. Formule za procjenu uspješnosti sakupljanja KMS**

#### **3.2.11.1. Prinos CD34+ stanica**

Prinos (*engl. yield*) CD34+stanica/kg TT izračunat je prema sljedećoj formuli:<sup>75</sup>

$$\text{Prinos CD34+ stanica} = \frac{\text{broj CD34+ stanica} \times 10^6/\text{L u produktu} \times \text{volumen produkta (L)}}{\text{tjelesna težina (kg)}}$$

#### **3.2.11.2. Kumulativni prinos CD34+ stanica**

Kumulativni prinos (*engl. cumulative yield*) CD34+ stanica izračunat je zbrajanjem prinosa CD34+stanica/kg TT sakupljenog tijekom obrade svakog pojedinog volumena krvi.

#### **3.2.11.3. Učinkovitost sakupljanja**

Učinkovitost sakupljanja (*engl. collection efficiency, CE*) stanica (leukocita, granulocita, mononuklearnih i CD34+ stanica, trombocita) staničnim separatorom izračunata je prema sljedećoj formuli:<sup>75</sup>

$$\text{Učinkovitost sakupljanja (\%)} = \frac{\text{apsolutni broj stanica u produktu leukaferenze} \times 100}{\text{obrađen vol. krvi} \times [(\text{br.stanica u krvi prije leukaferenze} + \text{br.stanica u krvi nakon leukaferenze}) / 2]}$$

#### **3.2.11.4. Faktor novačenja**

Za utvrđivanje dolazi li tijekom leukaferenze do dodatnog otpuštanja (*engl. recruitment*) tzv. novačenja stanica (leukocita, granulocita, mononuklearnih i CD34+ stanica, trombocita) iz koštane srži u perifernu krv korištena je sljedeća formula za izračunavanje faktora novačenja (*engl. recruitment factor*):<sup>120</sup>

$$\text{Faktor novačenja} = \frac{\text{apsolutni br. stanica u krvi nakon leukaferenze} + \text{apsolutni br sakupljenih stanica}}{\text{Apsolutni broj stanica u krvi prije leukaferenze}}$$

#### **3.2.12. Zamrzavanje i pohrana krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi**

Produkt leukaferenze se prije zamrzavanja centrifugira, a nakon toga se uklanja supernatant. Sedimentu stanica se pri temperaturi +4°C polako dodaje jednak volumen suspenzije krioprotektivne otopine dimetil-sulfoksida (DMSO) (WAK-Chemie GmbH, Steinbach, Njemačka) u autolognoj plazmi do finalne koncentracije od 10% DMSO u transplantatu. Transplantat je zamrznut u kontroliranim uvjetima i pohranjen u spremniku s tekućim dušikom.

#### **3.2.13. Program transplantacije krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi**

Bolesnici s multiplim mijelomom su u pripremi liječni visokim dozama melfalana<sup>114</sup>, dok su bolesnici s limfomom primili kemoterapiju BEAM.<sup>116</sup> Svi su bolesnici bili izolirani u jednoposteljnoj sobi po načelima obrnute izolacije, a prethodno im je uveden centralni venski kateter. Skrb bolesnika odgovara onoj granulocitopeničnog bolesnika. Transplantat KMS-a je odmrznut u vodenoj kupelji sa sterilnom fiziološkom otopinom zagrijanom na 37°C i infundiran brzinom od 10 do 20 mL/min kroz centralni venski kateter.

#### **3.2.14. Brzina hematološkog oporavka**

Nakon transplantacije je kod bolesnika praćena brzina hematološkog oporavka. Brzina hematološkog oporavka procijenjena je određivanjem i praćenjem broja leukocita i broja trombocita. Dan reinfuzije transplantata KMS je nulti dan

transplantacije. Bilježeni su dani nakon transplantacije kada je broj leukocita bio  $\geq 1,0 \times 10^9/L$ , granulocita  $\geq 0,5 \times 10^9/L$ , kao i trombocita  $\geq 20 \times 10^9/L$ , odnosno  $\geq 50 \times 10^9/L$ .

### 3.2.15. Veličina uzorka

Na osnovi rezultata iz literature očekivali smo da će razlika u apsolutnoj vrijednosti CD34+ stanica  $\times 10^6/L$  u perifernoj krvi prije početka i nakon sakupljanja KMS postupkom leukaferenze iznositi najmanje  $20 \times 10^6/L$ .<sup>79, 99, 102</sup> Također, očekivali smo i umjerenu do visoku povezanost početnih i završnih vrijednosti ( $r=0,5$ ). Da bismo ispitali takvu razliku između dva mjerenja, uz razinu značajnosti od 0,05 i snagu od 80%, bilo nam je potrebno najmanje 30 bolesnika. Izračun potrebne veličine uzorka proveden je uz pomoć statističkog programa SamplePower (SPSS INC, Chicago, IL).

### 3.2.16. Statistička analiza

Podaci su testirani na normalnost Kolmogorov-Smirnovljevim testom.<sup>121</sup> Budući da nisu nađena statistički značajna odstupanja od normalne distribucije podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u analizi su primjenjeni parametrijski testovi. Rezultati testiranja normalnosti raspodjela podataka prikazani su u tablici 19. u prilogu.

Statistička značajnost promjene vrijednosti pokazatelja tijekom leukaferenze u perifernoj krvi (broja leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica, trombocita i hematokrita) i produktu leukaferenze (broja leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica) između svih točaka mjerenja testirana je analizom varijance za ponavljana mjerenja. Kad je analizom varijance za ponavljana mjerenja nađen statistički značajan F omjer, t-testom za zavisne uzorke ispitana je razlika između dvije susjedne točke mjerenja. Obzirom da se tad radilo o višestrukim usporedbama Bonferronijevom korekcijom određena je granična p-vrijednost od



0,008 kada se radilo o 6 usporedbi, odnosno 0,007 kad je bilo 7 usporedbi kao vrijednost kojom se osigurava statistička značajnost na razini od 0,05.

Nadalje, višestrukom analizom varijance ispitan je mogući učinak dijagnoze (multipli mijelom vs. limfom) odnosno stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv („dobri“ vs. „loši“ mobilizatori) na tijek promjena.

Složena analiza varijance (2x2 ANOVA) korištena je za ispitivanje učinka dijagnoze i stupnja mobilizacije na faktor novačenja CD34+ stanica.

Statistička značajnost razlike u prinosu CD34+ stanica između bolesnika s multiplim mijelomom i bolesnika s limfomom, te između bolesnika koji su dobri i loši mobilizatori analizirana je t-testom za nezavisne uzorke.

Povezanost prinosa CD34+ stanica u produktu leukaferenze s brojem CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukaferenze ispitana je Spearmanovim  $\rho$  koeficijentom korelacije.

Utjecaj obrade 6 volumena krvi postupkom LVV u odnosu na standardno obrađena 4 volumena krvi na uspješnost sakupljanja transplantata u bolesnika s limfomom ispitana je McNemarovim testom, a u bolesnika s multiplim mijelomom McNemar-Bowkerovim testom.

Statistička značajnost razlike u subpopulacijama CD34+ stanica u produktu sakupljenom tijekom obrade 4 volumena krvi i produktu sakupljenom tijekom obrade 5. i 6. volumena krvi ispitana je t-testom za zavisne uzorke.

Prilikom svih usporedbi razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

Podaci o sakupljanju KMS-a analizirani su statističkim programom SPSS for Windows, Verzija 13.0.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Obilježja postupka leukaferoze velikog volumena krvi i sakupljenog produkta

Ukupno je analizirano 30 postupaka leukaferoze koji su učinjeni u 30 bolesnika. U svakom postupku ukupni volumen krvi je obrađen 6 puta. U tablici 3. navedena su obilježja provedenih postupaka leukaferoze.

*Tablica 3. Obilježja postupka leukaferoze prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (raspon)*

Obilježje	$x \pm SD$	raspon
Obrađen volumen krvi (mL)	26 979,37 $\pm$ 5 485,14	(17838-37291)
Trajanje postupka (min)	305,87 $\pm$ 7,63	(290-324)
Ulazni protok krvi (mL/min)	91,77 $\pm$ 18,84	(60,2-131,9)
Antikoagulantna otopina ACD-A (mL)	1 120,87 $\pm$ 230,05	(740-1510)
Heparin (i.j.)	6 725,22 $\pm$ 1 380,60	(4440-9060)
Volumen produkta (mL)	291,93 $\pm$ 13,26	(255-335)

Obilježja ukupnog produkta leukaferoze prikazana su u tablici 4.

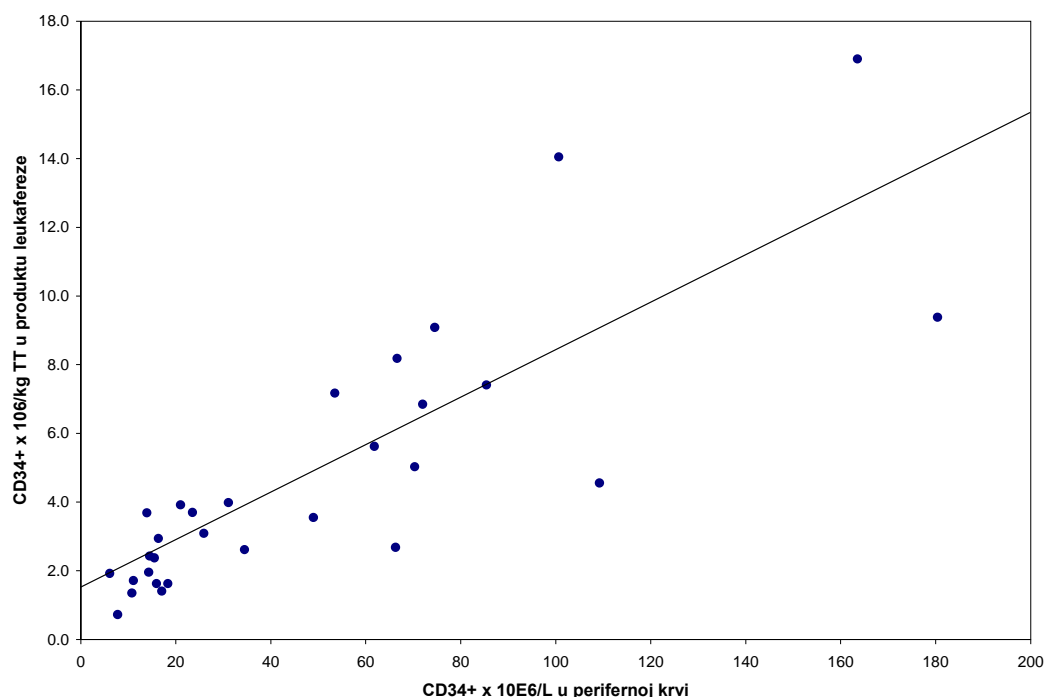
*Tablica 4. Obilježja ukupnog produkta leukaferoze prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (raspon)*

Obilježje	$X \pm SD$	Raspon
Volumen (mL)	291,93 $\pm$ 13,26	(255-335)
Leukociti $\times 10^9/L$	149,71 $\pm$ 61,40	(87,0-297,0)
Mononuklearne stanice %	54,99 $\pm$ 16,58	(28-83)
Mononuklearne stanice $\times 10^9/L$	80,36 $\pm$ 39,58	(37,2-176,8)
CD34+ stanica %	0,92 $\pm$ 0,80	(0,29-3,76)
CD34+ stanice $\times 10^7/L$	126,24 $\pm$ 107,19	(43,69-402,27)
Trombociti $\times 10^9/L$	1074,03 $\pm$ 626,05	(141,0-2424,0)
Leukociti $\times 10^8/kg$ TT	5,71 $\pm$ 1,97	(3,04-10,39)
Mononuklearne stanice $\times 10^8/kg$ TT	3,32 $\pm$ 3,86	(0,96-22,24)
CD34+ stanice $\times 10^6/kg$ TT	4,71 $\pm$ 3,79	(0,91-16,90)

Ukupni prinos CD34+ stanica  $\times 10^6/\text{kg}$  TT bio je statistički značajno veći kod dobrih mobilizatora ( $6,54 \pm 3,93 \times 10^6/\text{kg}$ ) TT nego kod loših mobilizatora ( $1,98 \pm 0,79 \times 10^6/\text{kg}$  TT) ( $p < 0,001$ , *t-test za nezavisne uzorke*). Nije nađena značajna razlika u prinosu CD34+ stanica između bolesnika s multiplim mijelomom ( $4,96 \pm 3,85 \times 10^6/\text{kg}$  TT) i bolesnika s limfomom ( $4,22 \pm 3,84 \times 10^6/\text{kg}$  TT), ( $p = 0,619$ , *t-test za nezavisne uzorke*).

#### 4.2. Korelacija broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukaferenze s ukupnim prinosom CD34+ stanica

Analizirana je povezanost broja CD34+ stanica  $\times 10^6/\text{L}$  u perifernoj krvi prije leukaferenze s ukupnim brojem CD34+ stanica ( $\times 10^6/\text{kg}$ ) TT sakupljenih u produktu leukaferenze (slika 6). Nađena je visoka povezanost između broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije aferenze i broja ukupno sakupljenih CD34+ stanica  $\times 10^6/\text{kg}$  TT ( $\rho = 0,860$ ,  $p < 0,001$ , *Spearmanov  $\rho$  koeficijent korelacije*).



Slika 6. Prikaz korelacije broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukaferenze s ukupnim brojem CD34+ stanica  $\times 10^6/\text{kg}$  TT sakupljenim u produktu leukaferenze ( $\rho = 0,860$ ,  $p < 0,001$ , *Spearmanov  $\rho$  koeficijent korelacije*).

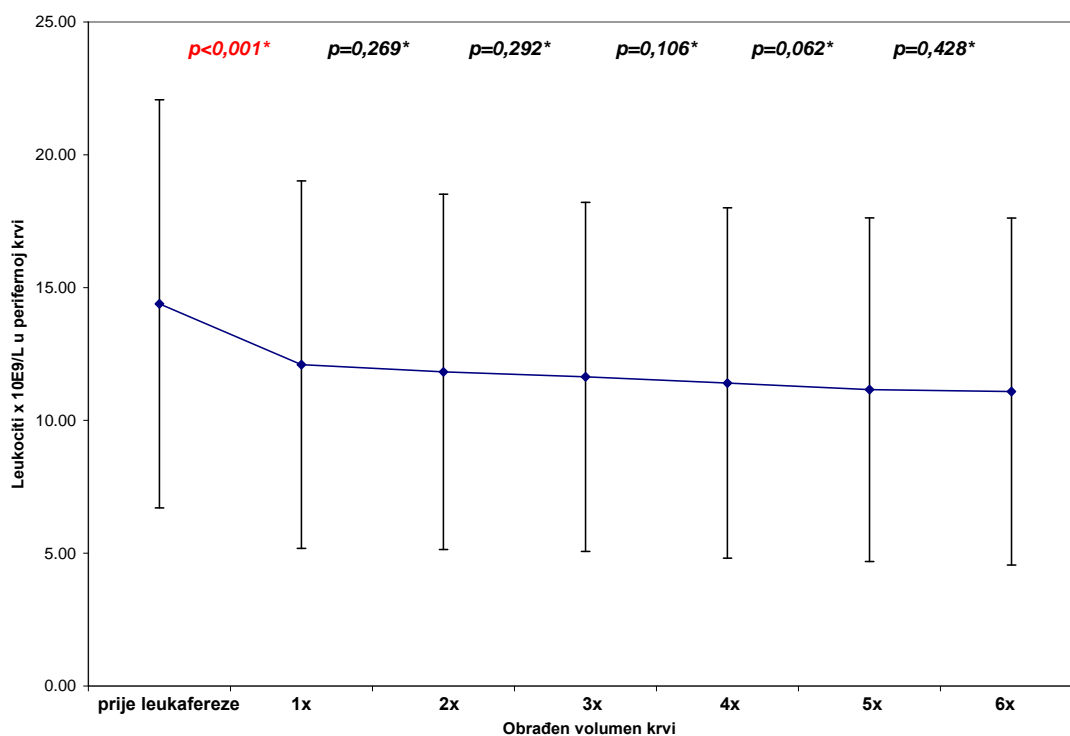
### 4.3. Periferna krv bolesnika prije i tijekom leukaferoze

U tablici 5. prikazana su obilježja periferne krvi prije početka leukaferoze te tijekom obrade 6 volumena krvi bolesnika.

*Tablica 5. Broj leukocita, postotak i broj mononuklearnih stanica, postotak i broj CD34+ stanica te postotak smanjenja broja CD34+ stanica u odnosu na vrijednosti u krvi prije leukaferoze i tijekom obrade 6 volumena krvi bolesnika prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija*

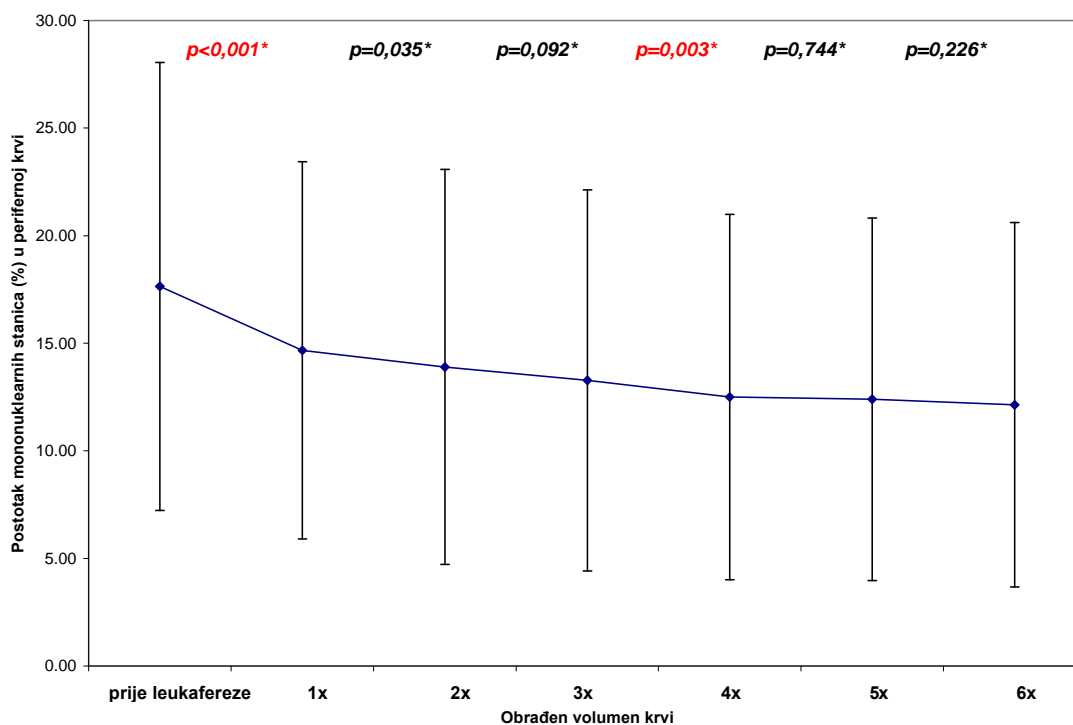
Obilježje	Prije leukaferoze	Obraden volumen krvi					
		1x	2x	3x	4x	5x	6x
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L	14,39 $\pm$ 7,68	12,10 $\pm$ 6,91	11,83 $\pm$ 6,69	11,64 $\pm$ 6,57	11,41 $\pm$ 6,59	11,16 $\pm$ 6,47	11,09 $\pm$ 6,53
Mononuklearne stanice (%)	17,64 $\pm$ 10,41	14,67 $\pm$ 8,76	13,90 $\pm$ 9,17	13,28 $\pm$ 8,85	12,50 $\pm$ 8,49	12,40 $\pm$ 8,42	12,14 $\pm$ 8,46
Mononuklearne stanice x10 <sup>9</sup> /L	2,02 $\pm$ 0,81	1,38 $\pm$ 0,57	1,26 $\pm$ 0,51	1,15 $\pm$ 0,41	1,05 $\pm$ 0,38	1,01 $\pm$ 0,35	0,98 $\pm$ 0,37
CD34+ stanice (%)	0,43 $\pm$ 0,49	0,30 $\pm$ 0,31	0,30 $\pm$ 0,38	0,28 $\pm$ 0,34	0,25 $\pm$ 0,29	0,27 $\pm$ 0,34	0,24 $\pm$ 0,31
CD34+ stanice x10 <sup>6</sup> /L	48,35 $\pm$ 44,80	27,86 $\pm$ 23,19	26,71 $\pm$ 25,29	23,42 $\pm$ 23,00	21,02 $\pm$ 19,73	19,63 $\pm$ 16,13	17,61 $\pm$ 14,05
% početnog broja CD34+ stanica	100,00	63,46 $\pm$ 20,38	58,17 $\pm$ 18,01	51,20 $\pm$ 17,02	47,72 $\pm$ 21,27	46,47 $\pm$ 19,08	45,95 $\pm$ 18,64

Dinamika promjene broja leukocita u perifernoj krvi tijekom leukaferoze prikazana je linijskim grafikonom (slika 7). Pronađena je statistički značajna promjena broja leukocita u krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=19,168$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV broj leukocita se postupno smanjuje, a post-hoc usporedba je pokazala da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja broja leukocita u perifernoj krvi između broja neposredno prije početka leukaferoze i nakon obrade prvog volumena krvi ( $p<0,001$ , t-test za zavisne uzorke). Nije pronađena statistički značajna interakcija između promjene broja leukocita u krvi i dijagnoze ( $F_{6,156}=0,367$ ,  $p=0,899$ , višestruka analiza varijance), kao ni između promjene broja leukocita i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,156}=0,722$ ,  $p=0,633$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



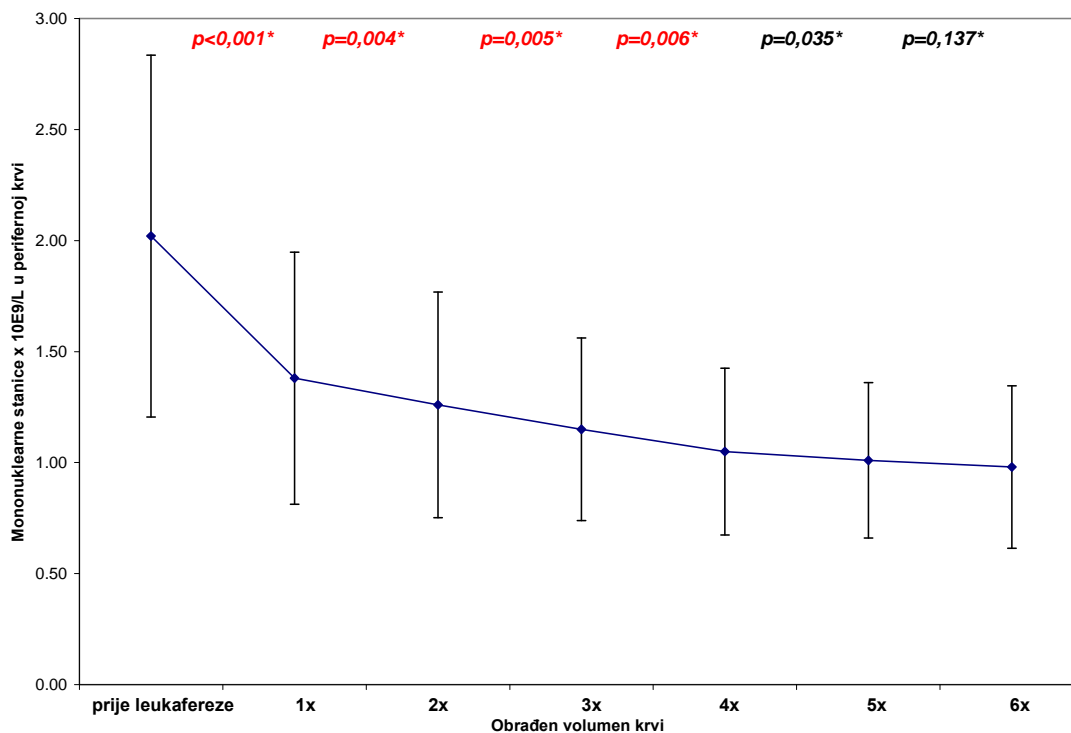
Slika 7. Dinamika promjene broja leukocita ( $\times 10^9/L$ ) u perifernoj krvi (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) tijekom postupka leukaferoze ( $F_{6,156}=19,168$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Dinamika promjene postotka mononuklearnih stanica u perifernoj krvi tijekom leukaferenze prikazana je linijskim grafikonom (slika 8). Pronađena je statistički značajna promjena postotka mononuklearnih stanica u perifernoj krvi u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=34,583$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV postotak mononuklearnih stanica u krvi se postupno smanjuje, a post-hoc usporedbom se uočilo da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja postotka mononuklearnih stanica u krvi opaženog između broja neposredno prije početka leukaferenze i 1. točke mjerenja ( $p<0,001$ , *t-test za zavisne uzorke*) te između 3. i 4. točke mjerenja ( $p=0,003$ , *t-test za zavisne uzorke*). Nije pronađena statistički značajna interakcija između promjene postotka mononukleara u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,156}=1,610$ ,  $p=0,148$ , višestruka analiza varijance), kao ni između promjene i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,156}=0,932$ ,  $p=0,473$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



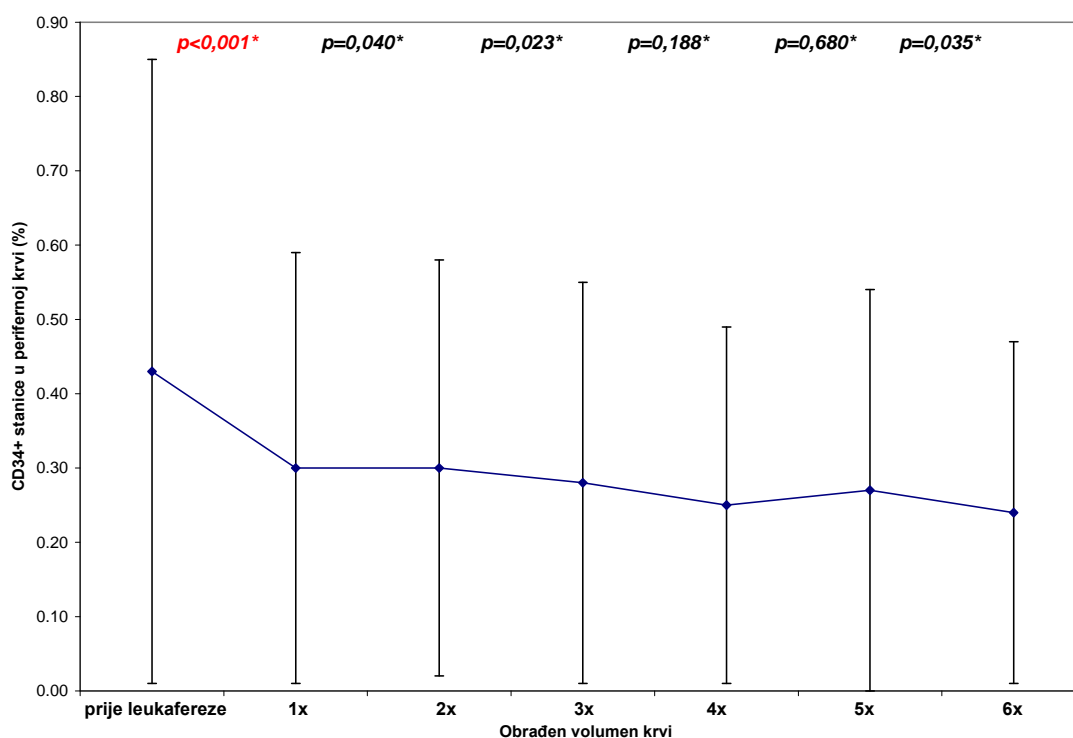
Slika 8. Dinamika promjene postotka mononuklearnih stanica u perifernoj krvi (aritmetička sredina±standardna devijacija) tijekom postupka leukaferenze ( $F_{6,156}=34,583$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\**t-test za zavisne uzorke*

Dinamika promjene broja mononuklearnih stanica u perifernoj krvi tijekom leukaferenze prikazana je linijskim grafikonom (slika 9). Pronađena je statistički značajna promjena broja mononuklearnih stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=42,029$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV broj mononuklearnih stanica u krvi se postupno smanjuje, a post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja broja mononuklearnih stanica u krvi tijekom obrade prva četiri volumena krvi. Nije pronađena statistički značajna interakcija između promjene broja mononuklearnih stanica u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,156}=1,554$ ,  $p=0,164$ , višestruka analiza varijance), kao ni između promjene broja mononuklearnih stanica i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,156}=0,425$ ,  $p=0,861$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 9. Dinamika promjene broja mononuklearnih stanica u perifernoj krvi (aritmetička sredina±standardna devijacija) tijekom postupka leukaferenze ( $F_{6,156}=42,029$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Dinamika promjene postotka CD34 stanica u perifernoj krvi tijekom leukaferenze prikazana je linijskim grafikonom (slika 10). Pronađena je statistički značajna promjena postotka CD34 stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=10,531$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV postotak CD34+ stanica u krvi se postupno smanjuje, a post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja postotka CD34 stanica u perifernoj krvi između broja neposredno prije početka leukaferenze i nakon obrade prvog volumena krvi ( $p<0,001$ , t-test za zavisne uzorke).

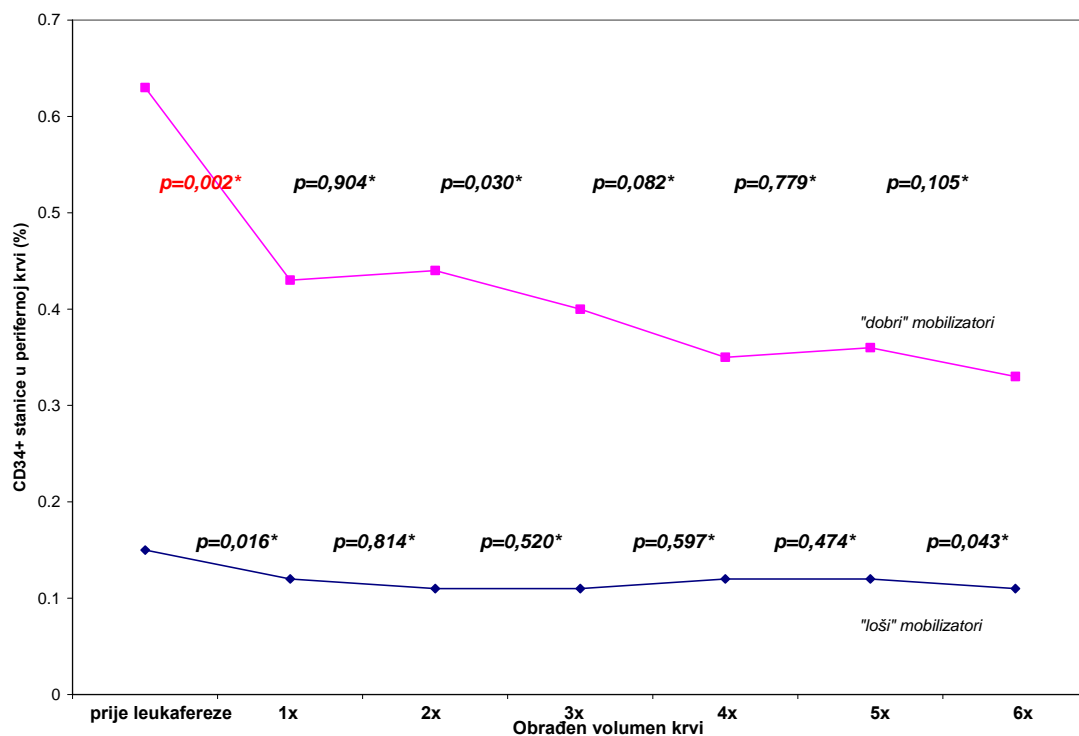


Slika 10. Dinamika promjene postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi (aritmetička sredina±standardna devijacija) tijekom postupka leukaferenze ( $F_{6,156}=10,531$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Nije pronadna statistički značajna interakcija između promjene postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,156}=1,159$ ,  $p=0,331$ , višestruka analiza varijance). Pronađena je statistički značajna interakcija između promjene postotka CD34+ stanica i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv

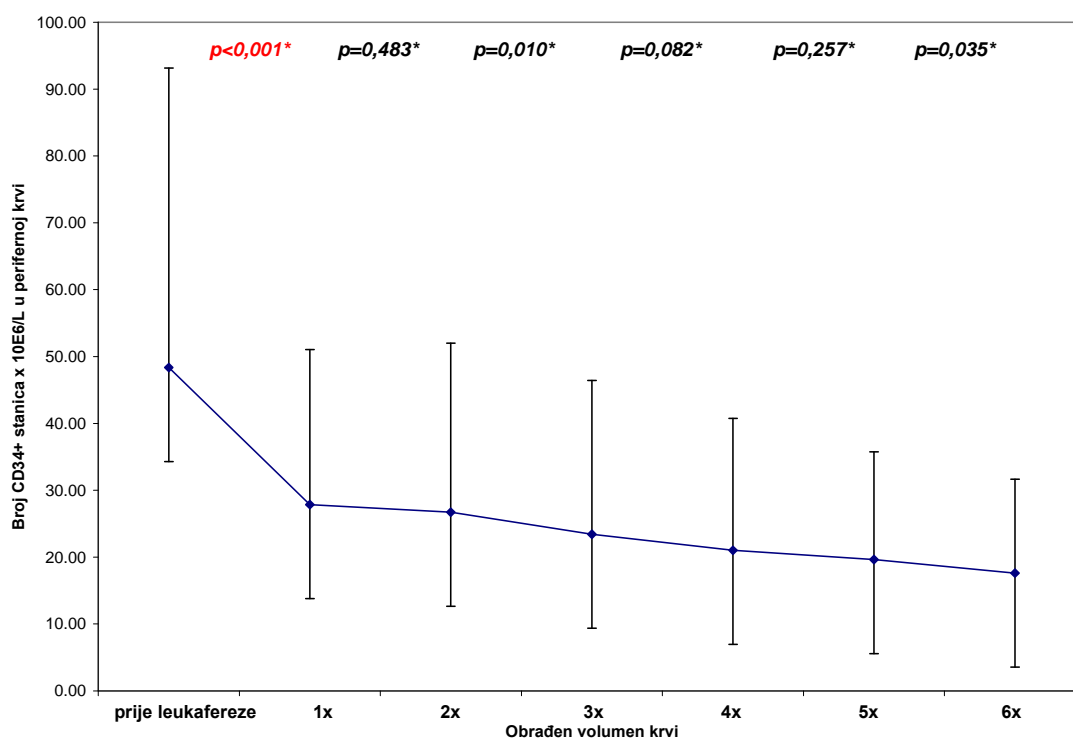


( $F_{6,156}=6,898$ ,  $p<0,001$ , višestruka analiza varijance); (slika 11). Kod dobrih mobilizatora kod kojih je u krvi prije leukaferenze broj CD34+ stanica bio  $\geq 20 \times 10^6/L$  pronađena je statistički značajna promjena postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,17}=13,843$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Kod loših mobilizatora kod kojih je broj CD34+ stanica u krvi prije leukaferenze bio  $< 20 \times 10^6/L$  nije pronađena statistički značajna promjena postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,11}=1,983$ ,  $p=0,081$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja).



Slika 11. Dinamika promjene postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi (aritmetička sredina) tijekom postupka leukaferenze kod „loših“ mobilizatora ( $F_{6,11}=1,983$ ,  $p=0,081$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja) i kod „dobrih“ mobilizatora ( $F_{6,17}=13,843$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Dinamika promjene broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi tijekom leukaferenze prikazana je linijskim grafikonom (slika 12). Pronađena je statistički značajna promjena broja CD34+ stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=15,368$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV broj CD34+ stanica  $\times 10^6/L$  u krvi se postupno smanjuje, a post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja broja CD34+ stanica u perifernoj krvi između broja neposredno prije početka leukaferenze i nakon obrade prvog volumena krvi ( $p<0,001$ , t-test za zavisne uzorke).

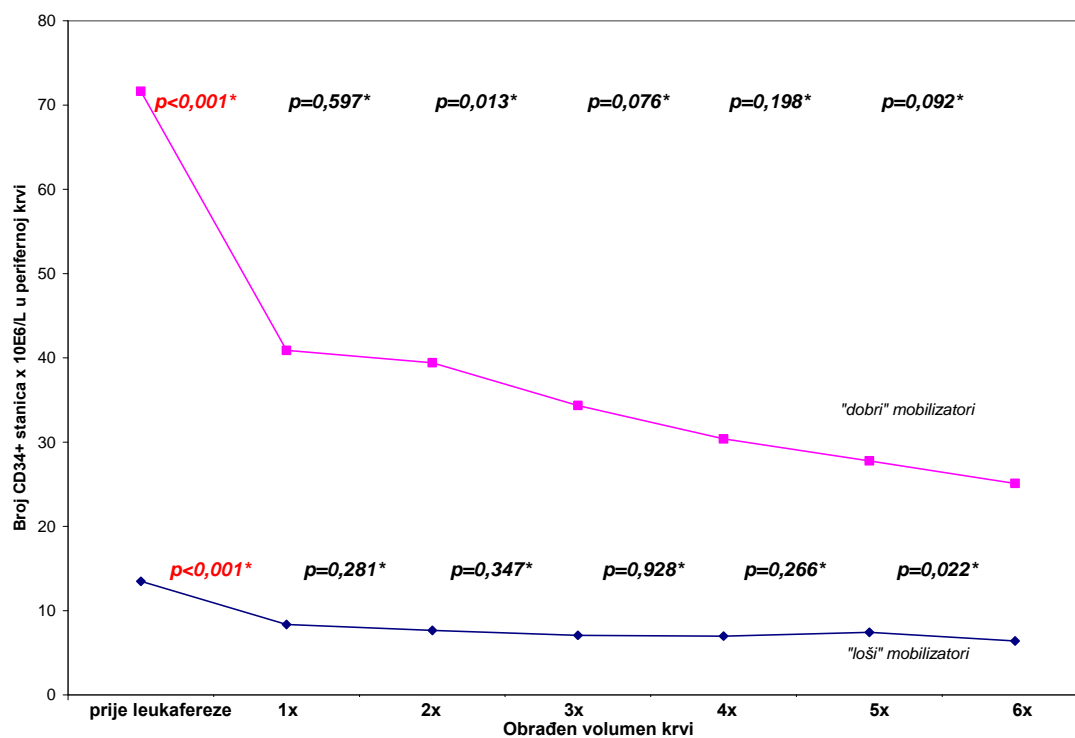


Slika 12. Dinamika promjene broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi (aritmetička sredina) tijekom postupka leukaferenze ( $F_{6,156}=15,368$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Nije pronadana statistički značajna interakcija između promjene broja CD34+ stanica  $\times 10^6/L$  u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,156}=1,663$ ,  $p=0,134$ , višestruka analiza varijance). Pronađena je statistički značajna interakcija između promjene broja CD34+ stanica u perifernoj krvi i stupnja mobilizacije CD34+

stanica u perifernu krv ( $F_{6,156}=7,700$ ,  $p<0,001$ , *višestruka analiza varijance*); (slika 13).

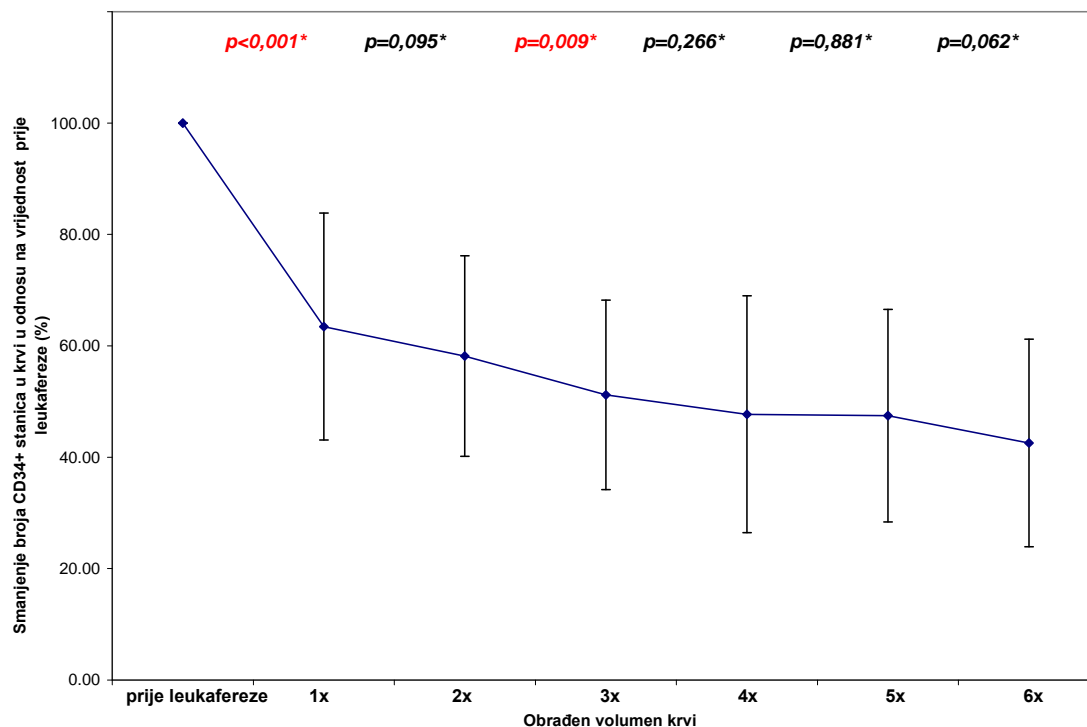
Kod dobrih mobilizatora kod kojih je broj CD34+ stanica u krvi prije leukaferenze bio  $\geq 20 \times 10^6/L$  pronađena je statistički značajna promjena postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,17}=26,961$ ,  $p<0,001$ , *analiza varijance za ponavljana mjerenja*). Kod loših mobilizatora kod kojih je u krvi prije leukaferenze broj CD34+ stanica bio  $< 20 \times 10^6/L$  pronađena je statistički značajna promjena postotka CD34+ stanica u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,11}=15,263$ ,  $p=0,081$ , *analiza varijance za ponavljana mjerenja*).



Slika 13. Dinamika promjene broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) tijekom postupka leukaferenze kod „loših“ mobilizatora ( $F_{6,11}=15,263$ ,  $p<0,001$ , *analiza varijance za ponavljana mjerenja*) i kod „dobrih“ mobilizatora ( $F_{6,17}=26,961$ ,  $p<0,001$ , *analiza varijance za ponavljana mjerenja*)

\*t-test za zavisne uzorke

Smanjenje broja CD34+ stanica  $\times 10^6/L$  u perifernoj krvi tijekom leukaferoze u odnosu na vrijednosti prije leukaferoze izraženo je u postocima i prikazano je linijskim grafikonom (Slika 14.). Pronađeno je statistički značajno smanjenje broja CD34+ stanica u odnosu na početan broj kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,156}=61,054$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Tijekom LVV dolazi do postupnog smanjenja, a post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja opaženog između broja neposredno prije početka leukaferoze i 1. točke mjerenja ( $p<0,001$ , t-test za zavisne uzorke) te 2. i 3. točke mjerenja ( $p=0,009$ , t-test za zavisne uzorke). Nije pronađena statistički značajna interakcija između smanjenja broja CD34+ stanica u odnosu na početan broj i dijagnoze ( $F_{6,156}=1,832$ ,  $p=0,212$ , višestruka analiza varijance), kao ni između smanjenja i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u krv ( $F_{6,156}=1,560$ ,  $p=0,162$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 14. Smanjenje broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) tijekom postupka leukaferoze u odnosu na vrijednosti prije leukaferoze izraženo u postocima ( $F_{6,156}=61,054$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

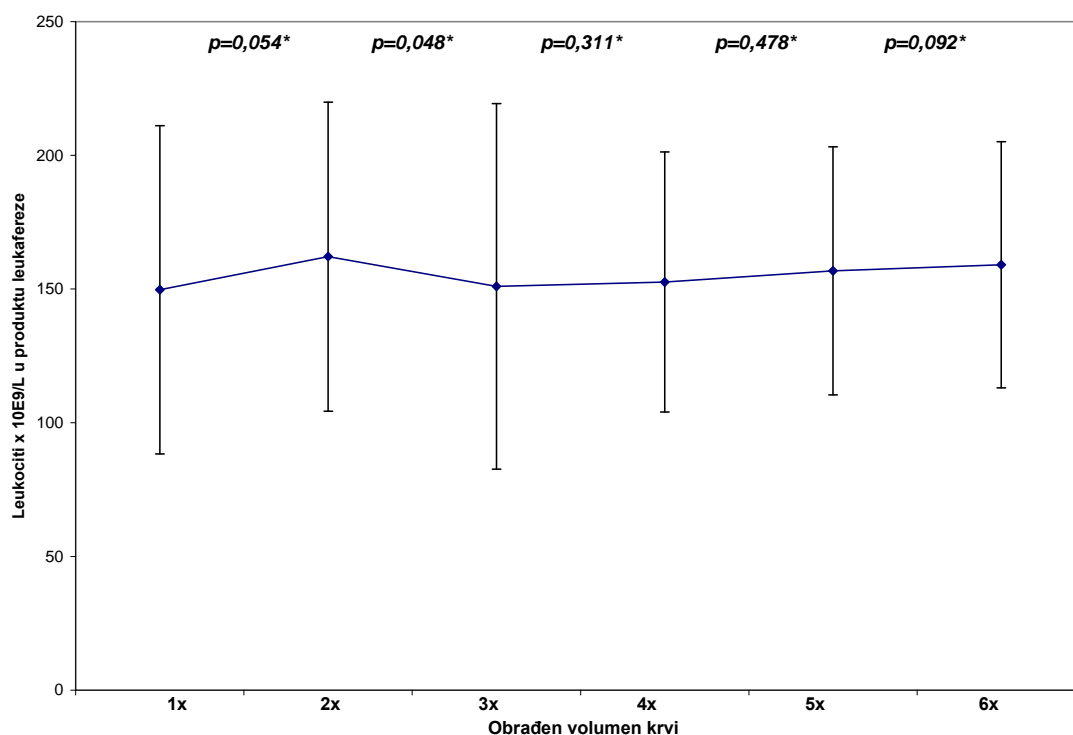
#### 4.4. Obilježja produkta leukaferoze uzastopno sakupljenog u 6 vrećica

Produkt leukaferoze je uzastopno sakupljan u 6 vrećica, a u svaku su vrećicu sakupljene stanice tijekom obrade jednog volumena krvi. Prosječan volumen produkta sakupljenog u pojedinačnoj vrećici bio je  $48,59 \pm 5,07$  mL ( $x \pm SD$ ). U tablici 6. prikazana su obilježja produkta leukaferoze uzastopno sakupljenog u 6 vrećica.

*Tablica 6. Obilježja produkta uzastopno sakupljenog u 6 vrećica tijekom leukaferoze: broj leukocita  $\times 10^9/L$ , prinos leukocita  $\times 10^8/kg$  TT, postotak mononuklearnih stanica (MNC), broj MNC  $\times 10^9/L$ , prinos MNC  $\times 10^8/kg$  TT, postotak CD34+ stanica, broj CD34+  $\times 10^9/L$  te prinos CD34+ stanica  $\times 10^6/kg$  TT prikazana su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija*

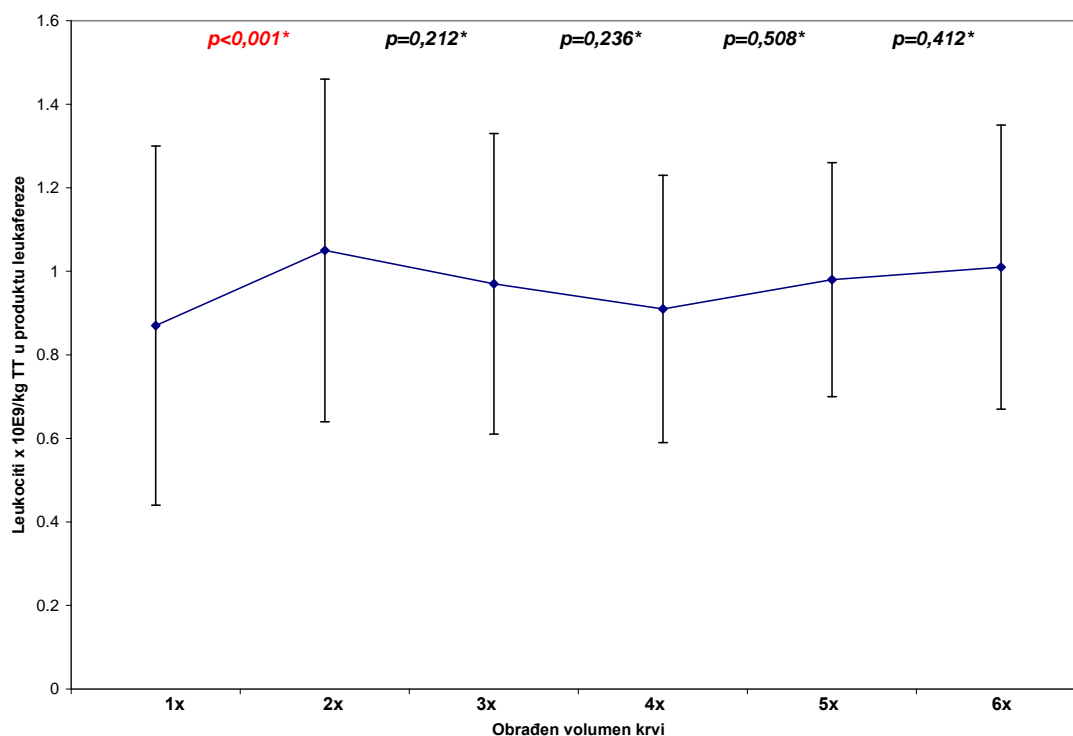
Obilježje	Vrećice s produktom sakupljenim tijekom obrade x volumena krvi					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Leukociti $\times 10^9/L$	149,70 $\pm 61,40$	162,12 $\pm 57,80$	150,99 $\pm 68,33$	152,63 $\pm 48,62$	156,77 $\pm 46,37$	159,09 $\pm 46,02$
Leukociti $\times 10^8/kg$	0,87 $\pm 0,43$	1,05 $\pm 0,41$	0,97 $\pm 0,36$	0,91 $\pm 0,32$	0,98 $\pm 0,28$	1,01 $\pm 0,34$
Mononuklearne stanice (%)	54,98 $\pm 16,58$	56,01 $\pm 16,00$	57,05 $\pm 16,34$	56,24 $\pm 17,55$	54,39 $\pm 17,01$	54,87 $\pm 18,18$
Mononuklearne stanice $\times 10^9/L$	80,36 $\pm 39,58$	88,45 $\pm 36,62$	82,19 $\pm 33,55$	80,49 $\pm 29,81$	81,60 $\pm 32,06$	79,62 $\pm 27,50$
Mononuklearne stanice $\times 10^8/kg$ TT	0,45 $\pm 0,23$	0,56 $\pm 0,22$	0,53 $\pm 0,19$	0,50 $\pm 0,19$	0,48 $\pm 0,18$	0,49 $\pm 0,19$
CD34+ stanice (%)	0,91 $\pm 0,80$	0,91 $\pm 0,85$	0,94 $\pm 0,78$	0,89 $\pm 0,66$	0,86 $\pm 0,64$	0,85 $\pm 0,54$
CD34+ stanice $\times 10^6/L$	12,62 $\pm 10,72$	14,37 $\pm 14,23$	14,55 $\pm 16,27$	13,41 $\pm 14,14$	13,65 $\pm 10,07$	12,99 $\pm 9,13$
CD34+ stanice $\times 10^6/kg$ TT	0,71 $\pm 0,61$	0,87 $\pm 0,73$	0,87 $\pm 0,84$	0,82 $\pm 0,82$	0,80 $\pm 0,60$	0,82 $\pm 0,51$

Dinamika promjene broja leukocita  $\times 10^9/L$  u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 15). Nije pronađena statistički značajna promjena broja leukocita u produktu leukaferoze prikupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,125}=1,489$ ,  $p=0,198$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja).



Slika 15. Dinamika promjene broja leukocita  $\times 10^9/L$  (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferoze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,125}=1,489$ ,  $p=0,198$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

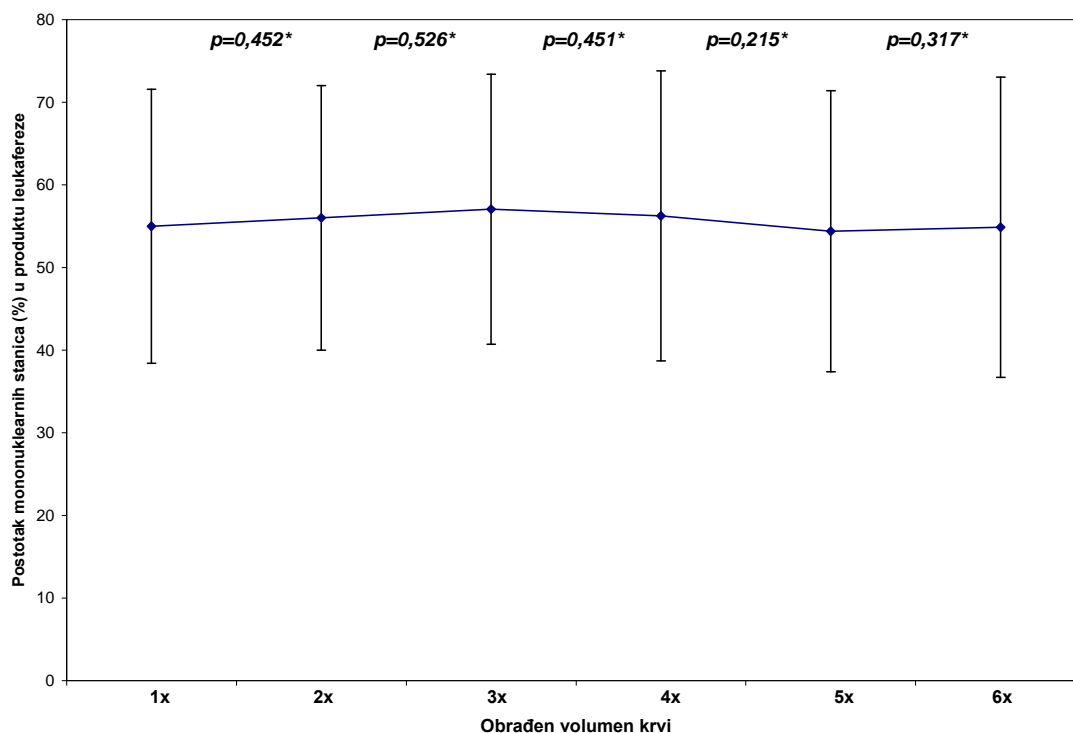
Dinamika promjene prinosa leukocita  $\times 10^8/\text{kg TT}$  u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (Slika 16). Pronađena je statistički značajna promjena prinosa leukocita u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,125}=3,187$ ,  $p=0,041$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta promjena rezultat statistički značajno manjeg prinosa leukocita u 1. vrećici u kojoj je sakupljen produkt tijekom prve obrade ukupnog volumena krvi u odnosu na ostale vrećice ( $p<0,001$ ,  $t$ -test za zavisne uzorke). Prinos leukocita u preostale 4 vrećice bio je bez promjene ( $F_{4,100}=2,172$ ,  $p=0,080$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Nije pronađena statistički značajna interakcija između prinosa leukocita i dijagnoze ( $F_{5,125}=0,333$ ,  $p=0,892$ , višestruka analiza varijance) kao ni interakcija između prinosa leukocita i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u krv ( $F_{5,125}=0,478$ ,  $p=0,792$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 16. Dinamika promjene prinosa leukocita (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferoze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,125}=3,187$ ,  $p=0,041$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)

\* $t$ -test za zavisne uzorke

Dinamika promjene postotka mononuklearnih stanica u produktu leukafereze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 17). Nije pronađena statistički značajna promjena postotka mononuklearnih stanica u produktu leukafereze prikupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,130}=0,559$ ,  $p=0,732$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja).

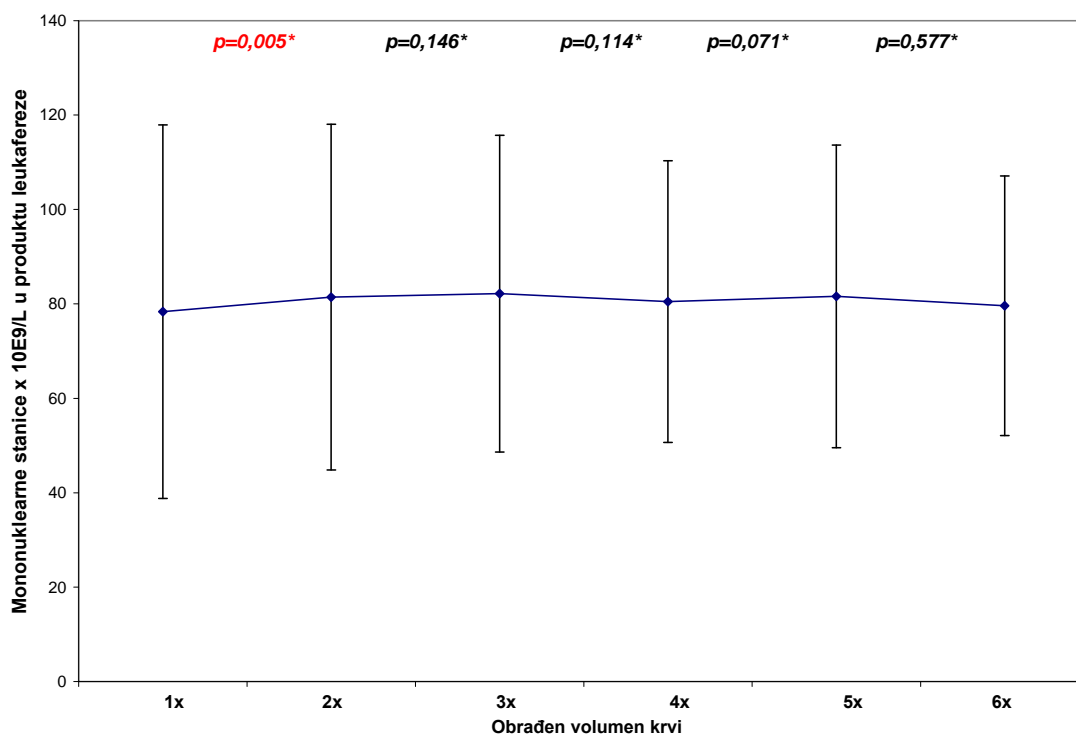


Slika 17. Dinamika promjene postotka mononuklearnih stanica (aritmetička sredina±standardna devijacija) u produktu leukafereze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,130}=0,559$ ,  $p=0,732$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)

\*t-test za zavisne uzorke



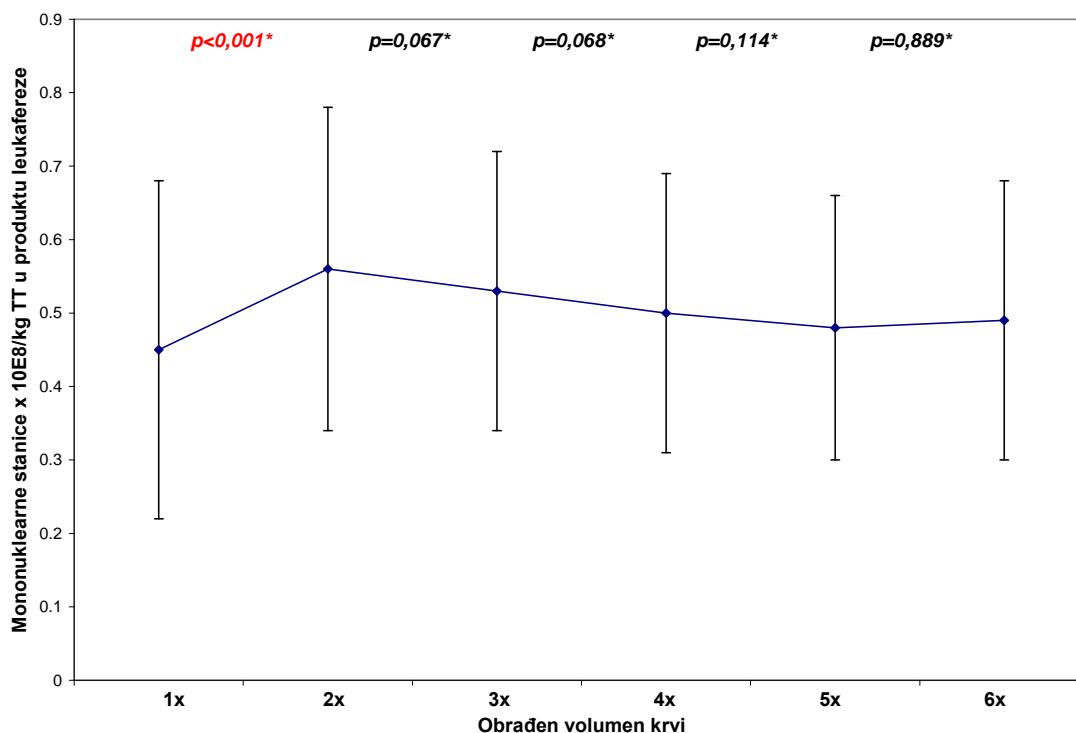
Dinamika promjene broja mononuklearnih stanica ( $\times 10^9/L$ ) u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 18). Pronađena je statistički značajna promjena broja mononuklearnih stanica  $\times 10^9/L$  u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,125}=3,979$ ,  $p=0,002$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta promjena rezultat statistički značajno manjeg broja sakupljenih mononuklearnih stanica  $\times 10^9/L$  u 1. vrećici u kojoj je sakupljen produkt tijekom prve obrade ukupnog volumena krvi u odnosu na ostale vrećice ( $p=0,005$ , *t-test za zavisne uzorke*). Nije pronađena statistički značajna interakcija između broja mononuklearnih stanica  $\times 10^9/L$  i dijagnoze ( $F_{5,125}=0,188$ ,  $p=0,967$ , višestruka analiza varijance) kao ni interakcija između broja mononuklearnih stanica i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{5,125}=0,574$ ,  $p=0,720$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 18. Dinamika promjene broja mononuklearnih stanica  $\times 10^9/L$  (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferoze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,125}=3,979$ ,  $p=0,002$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)

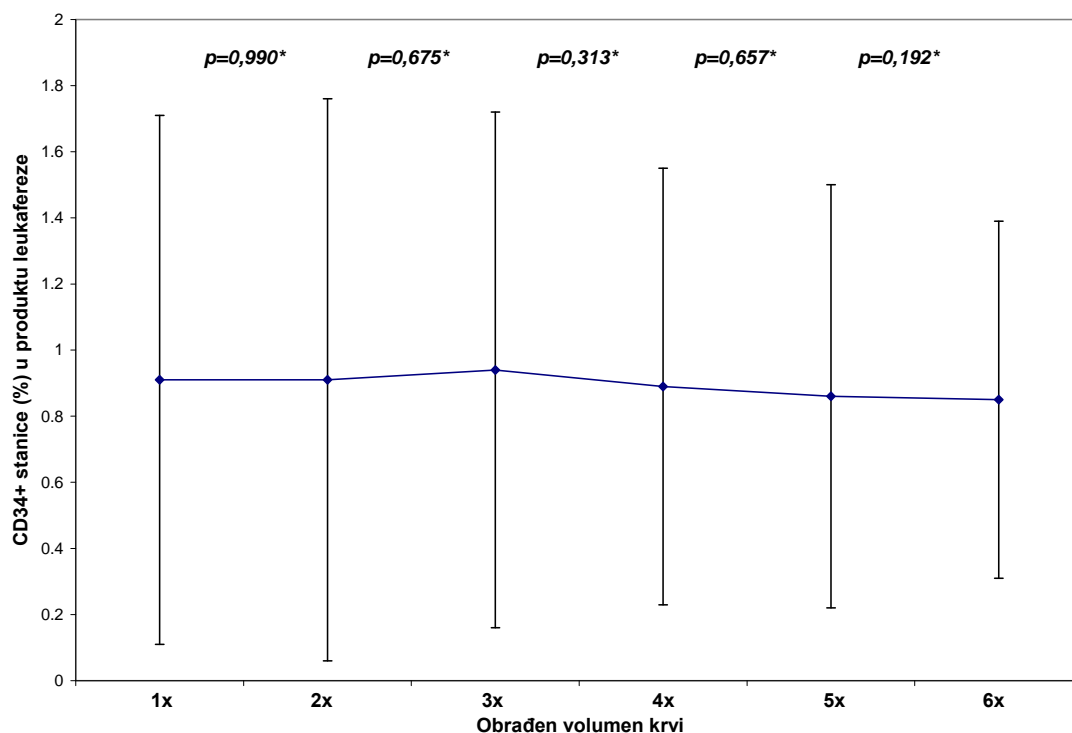
\**t-test za zavisne uzorke*

Dinamika promjene prinosa mononuklearnih stanica ( $\times 10^8/\text{kg TT}$ ) u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 19). Pronađena je statistički značajna promjena prinosa mononuklearnih stanica u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,125}=4,808$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta promjena rezultat statistički značajno manje prinosa mononuklearnih stanica u 1. vrećici u kojoj je sakupljen produkt tijekom obrade prvog volumena krvi u odnosu na ostale vrećice ( $p<0,001$ ,  $t$ -test za zavisne uzorke). Nije pronađena statistički značajna interakcija između prinosa mononuklearnih stanica i dijagnoze ( $F_{5,125}=0,385$ ,  $p=0,858$ , višestruka analiza varijance) kao ni interakcija između prinosa mononuklearnih stanica i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{5,125}=1,023$ ,  $p=0,407$ , višestruka analiza varijance) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 19. Dinamika promjene prinosa mononuklearnih stanica (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi ( $F_{5,125}=4,808$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\* $t$ -test za zavisne uzorke

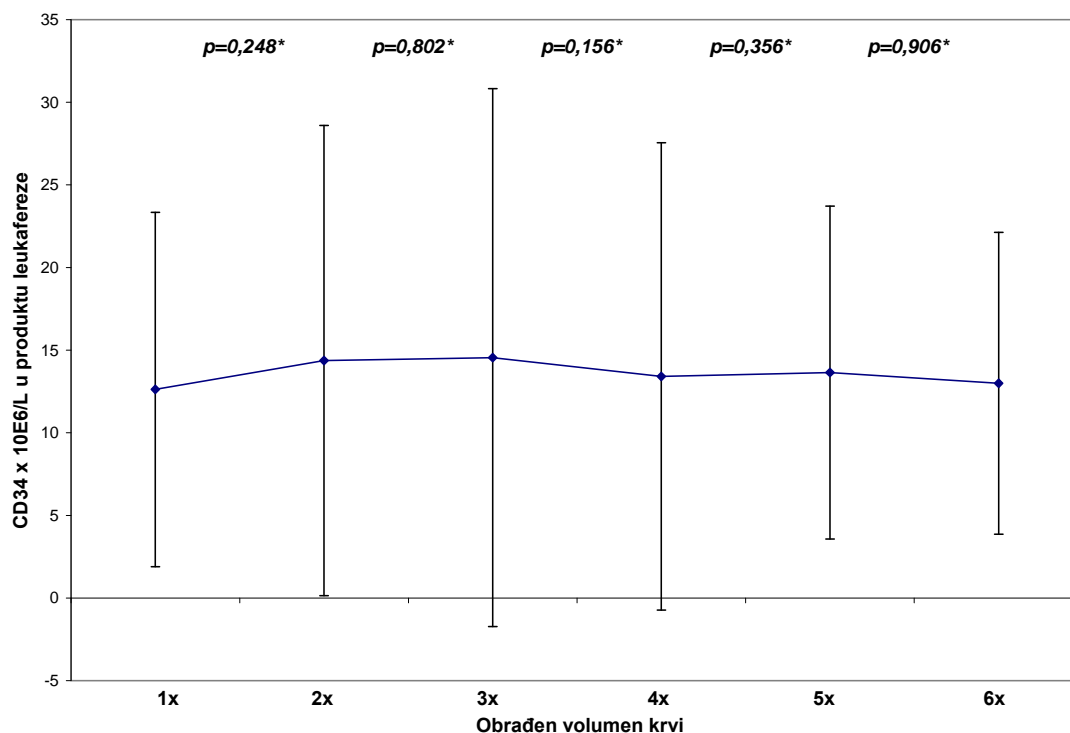
Dinamika promjene postotka CD34+ stanica u produktu leukaferoze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (Slika 20.). Nije pronađena statistički značajna promjena postotka CD34+ stanica u produktu leukaferoze prikupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,130}=0,771$ ,  $p=0,572$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja).



Slika 20. Dinamika promjene postotka CD34+ stanica (aritmetička sredina±standardna devijacija) u produktu leukaferoze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,130}=0,771$ ,  $p=0,572$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)

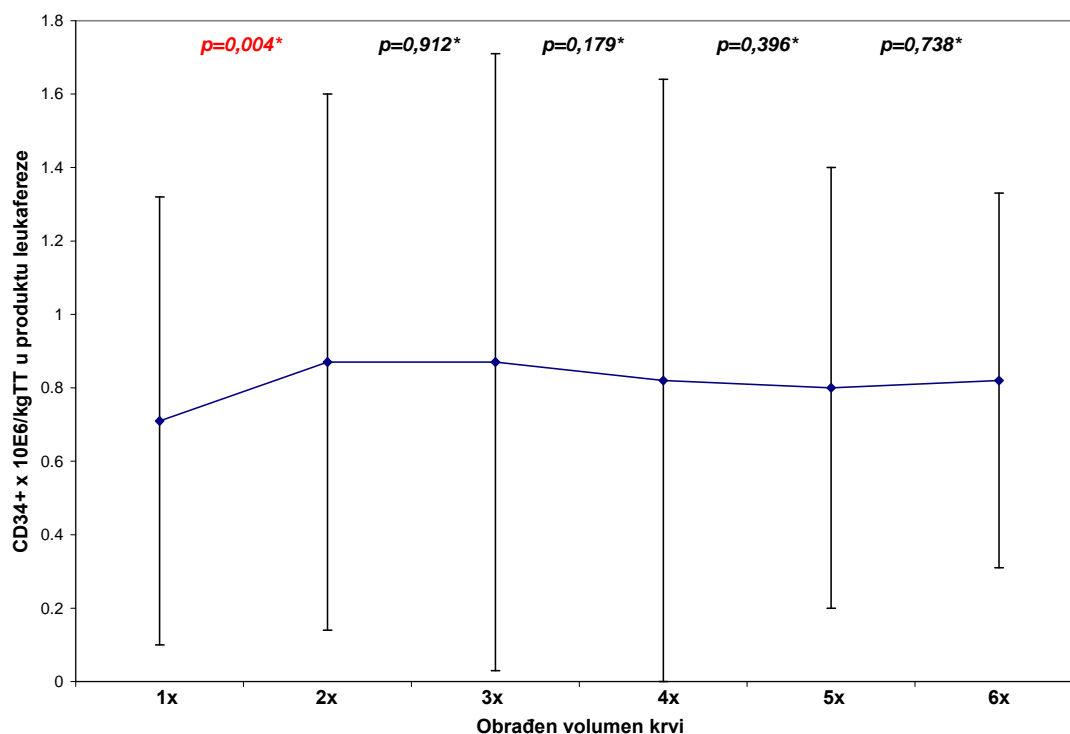
\*t-test za zavisne uzorke

Dinamika promjene broja CD34+ stanica  $\times 10^6/L$  u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 21). Nije pronađena statistički značajna promjena broja CD34+ stanica u produktu leukaferenze prikupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,130}=0,242$ ,  $p=0,943$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja).



Slika 21. Dinamika promjene broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferenze sakupljenom u šest vrećica tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,130}=0,242$ ,  $p=0,943$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

Dinamika promjene prinosa CD34+ stanica ( $\times 10^6/\text{kg TT}$ ) u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 22). Pronađena je statistički značajna promjena prinosa CD34+ stanica u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica ( $F_{5,130}=3,082$ ,  $p=0,012$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta promjena rezultat značajno manjeg prinosa CD34+ stanica u 1. vrećici u kojoj je sakupljen produkt tijekom obrade prvog ukupnog volumena krvi ( $p=0,004$ , t-test za zavisne uzorke). Prinos CD34+ stanica u preostalim vrećicama bio je bez promjena. Nije pronajđena statistički značajna interakcija između prinosa CD34+ stanica i dijagnoze ( $F_{5,130}=1,071$ ,  $p=0,380$ , višestruka analiza varijance). Iako je prinos CD34+ stanica bio veći kod dobrih mobilizatora nije pronajđena interakcija između prinosa CD34+ stanica i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u krv ( $F_{5,130}=0,342$ ,  $p=0,886$ , višestruka analiza varijance) jer je dinamika prinosa u obje skupine bila jednaka.



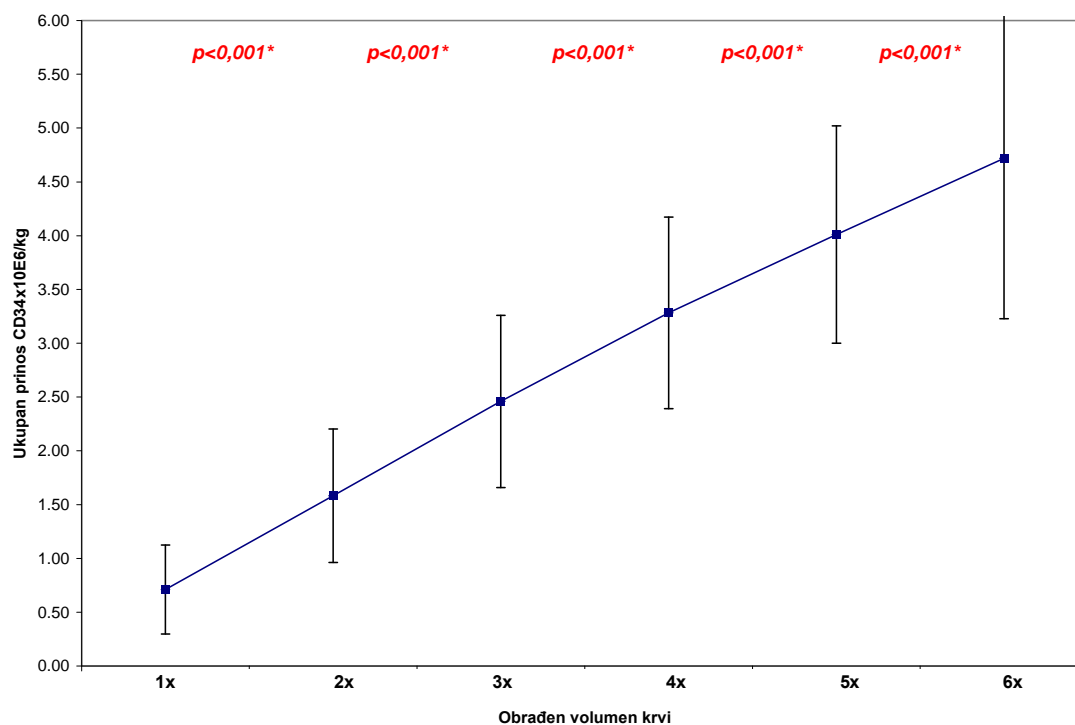
Slika 22. Dinamika promjene prinosa CD34+ stanica (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferenze sakupljenom tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,130}=3,082$ ,  $p=0,012$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)

\*t-test za zavisne uzorke

#### 4.5. Kumulativni prinos CD34+ stanica

Kumulativni prinos CD34+ stanica  $\times 10^6/\text{kg}$  TT tijekom leukaferoze prikazan je linijskim grafikonom (slika 23). Nađeno je statistički značajno povećanje prinosa CD34+ stanica kroz šest mjernih točaka ( $F_{5,130}=40,358$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog povećanja prinosa CD34 stanica opaženog između svih točaka mjerenja ( $p<0,001$ , t-test za zavisne uzorke).

Nije pronađena statistički značajna interakcija između kumulativnog prinosa CD34+ stanica i dijagnoze ( $F_{5,130}=0,289$ ,  $p=0,918$ , višestruka analiza varijance). Iako je prinos CD34+ stanica kod dobrih mobilizatora bio veći nego kod loših mobilizatora nije pronađena interakcija između stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv i kumulativnog prinosa CD34+ stanica ( $F_{5,130}=1,129$ ,  $p=0,348$ , višestruka analiza varijance) jer se kumulativni prinos u obje skupine značajno povećavao cijelim tijekom LVV.



Slika 23. Kumulativni prinos CD34+ stanica (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) tijekom postupka leukaferoze ( $F_{5,130}=40,358$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke

#### 4.6. Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica postupkom leukaferoze

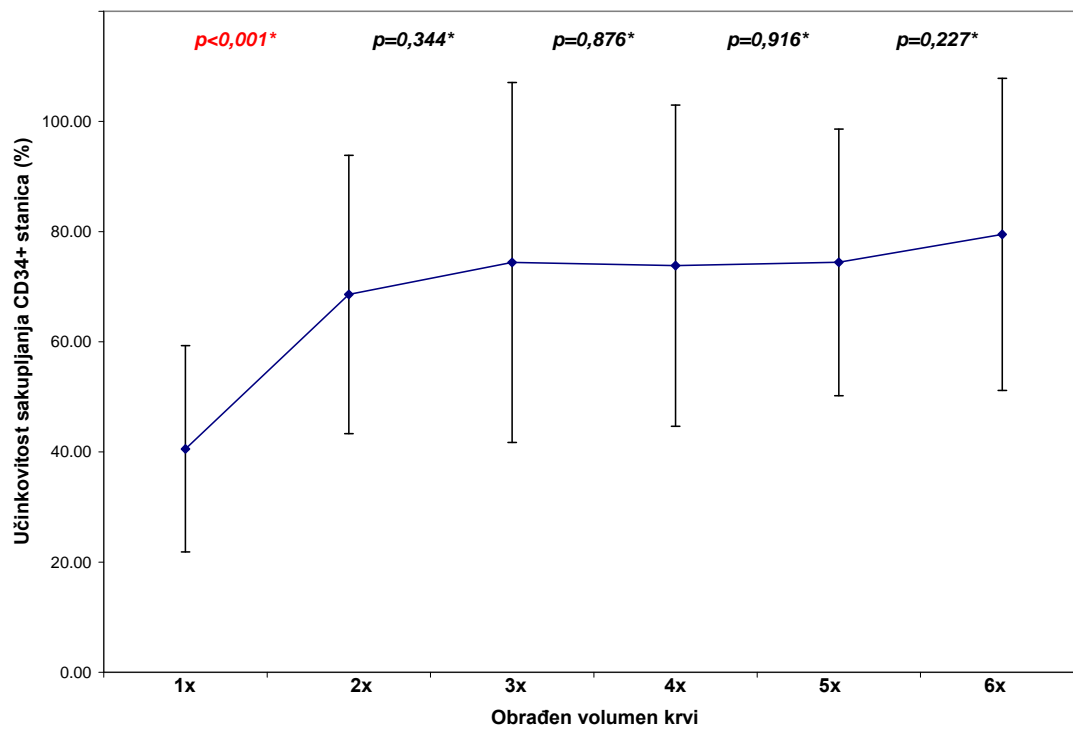
Ukupna učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica postupkom LVV iznosila je  $70,93 \pm 33,21$  %. Dinamika promjene učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica tijekom postupka leukaferoze prikazana je u tablici 7.

Tablica 7. Dinamika promjene učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica (%) tijekom obrade 6 volumena bolesnikove krvi prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

	Vrećice s produktom sakupljenim tijekom obrade					
	x volumena krvi					
Učinkovitost sakupljanja CD34+ st. (%)	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	40,56	68,58	74,40	73,82	74,43	79,49
	$\pm 18,73$	$\pm 25,27$	$\pm 32,67$	$\pm 29,17$	$\pm 24,21$	$\pm 28,32$

Dinamika promjene učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica tijekom obrade 6 volumena krvi prikazana je linijskim grafikonom (slika 24). Pronađena je statistički značajna promjena učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica tijekom obrade 6 volumena krvi ( $F_{5,125}=9,927$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta promjena rezultat statistički značajno manje učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica tijekom obrade prvog volumena krvi u odnosu na obradu drugog volumena krvi ( $p<0,001$ ,  $t$ -test za zavisne uzorke). U daljnjem tijeku LVV učinkovitost sakupljanja se postupno povećava, a obradom šestog volumena krvi doseže čak 79,49%.

Nije pronađena statistički značajna interakcija između učinkovitosti sakupljanja CD34+ stanica i dijagnoze ( $F_{5,125}=1,208$ ,  $p=0,309$ ), kao ni interakcija između učinkovitosti i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{5,125}=1,570$ ,  $p=0,173$ ) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 24. Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica (aritmetička sredina±standardna devijacija) tijekom obrade šest volumena krvi ( $F_{5,125}=9,927$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\*t-test za zavisne uzorke



#### 4.7. Usporedba uspješnosti sakupljanja CD34+ stanica obradom 4 naspram 6 volumena krvi bolesnika

U daljnoj je analizi uspoređeno koliki je prinos CD34+ stanica u istih bolesnika ako je ukupan volumen krvi obrađen standardnom leukaferozom samo 4 puta naspram obrade 6 puta postupkom LVV (tablica 8).

*Tablica 8. Usporedba prinosa leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica u istih bolesnika standardnom obradom 4 volumena krvi vs. obradom 6 volumena LVV prikazana kao aritmetička sredina ± standardna devijacija*

Prinos	Standardna leukaferaza (4x ukupan volumen krvi)	Leukaferaza velikog volumena (6x ukupan volumen krvi)	<i>p</i> *
Leukociti $\times 10^8/\text{kg TT}$	4,72±2,11	5,71±1,97	<i>p</i> <0,001
Mononuklearne stanice $\times 10^8/\text{kg TT}$	2,69±1,98	3,32±3,86	<i>p</i> <0,001
CD34+ stanice $\times 10^6/\text{kg TT}$	3,28±2,89 $\times 10^6/\text{kg}$	4,71±3,79	<i>p</i> <0,001

\**t*-test za zavisne uzorke

Uspješnost sakupljanja transplantata ( $\text{CD34+} > 3,5 \times 10^6/\text{kg TT}$ ) nakon obrade 4 odnosno 6 volumena krvi prikazana je u tablici 9.

*Tablica 9. Usporedba uspješnosti sakupljanja transplantata ( $\text{CD34+} > 3,5 \times 10^6/\text{kg TT}$ ) tijekom obrade 4 vs. 6 volumena krvi u 30 ispitivanih bolesnika (*p*=0,001, McNemarov test).*

Obrada	Bolesnici	
	$\text{CD34+} < 3,5 \times 10^6/\text{kg TT}$ N (%)	$\text{CD34+} \geq 3,5 \times 10^6/\text{kg TT}$ N (%)
4 volumena krvi	21 (70,0%)	9 (30,0%)
6 volumena krvi	10 (33,3 %)	20 (66,7 %)

Tijekom standardne obrade 4 ukupna volumena krvi u 9 (30,0%) bolesnika prikupljen je transplantat, tj. više od  $3,5 \times 10^6/\text{kg TT}$  CD34+ stanica, dok je tijekom

obrade 6 ukupnih volumena krvi kod tih istih bolesnika transplantat prikupljen u 20 (63,7%) slučajeva, što je statistički značajno više ( $p=0,001$ , *McNemarov test*).

Uspješnost sakupljanja transplantata ( $CD34+ > 3,5 \times 10^6 / \text{kgTT}$ ) nakon obrade 4 odnosno 6 volumena krvi kod bolesnika s multiplim mijelomom prikazana je u tablici 10.

*Tablica 10. Usporedba uspješnosti sakupljanja transplantata ( $CD34+ > 3,5 \times 10^6 / \text{kgTT}$ ) tijekom obrade 4 vs. 6 volumena krvi u 10 ispitivanih bolesnika s limfomom ( $p=0,250$ , *McNemarov test*).*

Obrada	Bolesnici	
	CD34+ < $3,5 \times 10^6 / \text{kgTT}$ N (%)	CD34+ $\geq 3,5 \times 10^6 / \text{kgTT}$ N (%)
4 volumena krvi	8 (80,0%)	2 (20,0%)
6 volumena krvi	5 (50,0%)	5 (50,0%)

Obradom 4 volumena krvi bolesnika s limfomom, samo bi u dvoje (20%) bolesnika transplantat bio sakupljen jednim postupkom leukaferenze, dok je produživanjem leukaferenze i obradom 6 volumena krvi u istih bolesnika transplantat sakupljen u 5 (50%) slučajeva. Ovi rezultati upućuju na potencijalnu učinkovitost produživanja leukaferenze, međutim ta razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0,250$ , *McNemarov test*), što je vjerojatno posljedica malog broja bolesnika.

Uspješnost sakupljanja transplantata nakon obrade 4 odnosno 6 volumena krvi kod bolesnika s multiplim mijelomom prikazana je u tablici 11. Obradom samo 4 volumena krvi u 35% bolesnika s multiplim mijelomom je sakupljeno više od  $3,5 \times 10^6 / \text{kg TT}$  CD34+ stanica, dok je obradom 6 volumena krvi transplantat sakupljen čak u 75% bolesnika. Budući da je u ovih bolesnika planirano liječenje dvostrukom transplantacijom, dodatno je analizirano u koliko je njih postupkom LVV sakupljen dvostruki transplantat tj.  $CD34+ > 7 \times 10^6 / \text{kgTT}$ . Standardnim postupkom leukaferenze obradom 4 volumena krvi bi u 6 (30%) bolesnika s multiplim mijelomom bio sakupljen jedan transplantat, a samo bi u jednog (5%) bolesnika bila sakupljena dva transplantata. Produživanjem

leukaferoze i obradom ukupno 6 volumena krvi u istih bolesnika jedan transplantat je sakupljen u 9 (45%) bolesnika, a dva transplantata čak u 6 (30%) bolesnika ( $p=0,002$ , McNemar-Bowkerov test).

*Tablica 11. Usporedba uspješnosti sakupljanja jednog transplantata ( $3,5 \leq CD34+ < 7 \times 10^6/kgTT$ ) odnosno dva transplantata ( $CD34+ \geq 7 \times 10^6/kgTT$ ) tijekom obrade 4 vs. 6 volumena krvi u 20 bolesnika s multiplim mijelomom ( $p=0,002$ , McNemar-Bowkerov test).*

Obrada	Bolesnici		
	CD34+ < 3,5 x10 <sup>6</sup> /kgTT N (%)	3,5 ≤ CD34+ < 7 x10 <sup>6</sup> /kgTT N (%)	CD34+ ≥ 7 x10 <sup>6</sup> /kgTT N (%)
4 volumena krvi	13 (65,0%)	6 (30,0%)	1 (5,0%)
6 volumena krvi	5 (25,0%)	9 (45,0%)	6 (30,0%)

#### 4.8. Faktor novačenja

U tablici 12. je prikazan ukupan broj stanica u perifernoj krvi prije i nakon leukaferoze, broj ukupno sakupljenih stanica i faktor novačenja za leukocite, mononuklearne stanice, CD34+ stanice, granulocite i trombocite.

Zbroj CD34+ stanica preostalih u perifernoj krvi nakon leukaferoze i ukupno sakupljenih CD34+ stanica bio je  $3,23 \pm 1,61$  puta veći od ukupnog broja stanica koje su bile dostupne u perifernoj krvi prije početka leukaferoze, što ukazuje da tijekom leukaferoze dolazi do dodatnog otpuštanja tzv. novačenja CD34+ stanica iz koštane srži u perifernu krv. Nije pronađen statistički značajan učinak dijagnoze na faktor novačenja za CD34+ stanice ( $F_{1,26}=2,197$ ,  $p=0,112$ , složena analiza varijance). Pronađen je statistički značajan glavni učinak stupnja mobilizacije ( $F_{1,26}=4,473$ ,  $p=0,044$ , složena analiza varijance) i to takav da je faktor novačenja bio viši kod «loših mobilizatora» ( $4,14 \pm 0,49$ ) nego kod «dobrih mobilizatora» ( $2,84 \pm 0,37$ ).

*Tablica 12. Ukupan broj stanica u perifernoj krvi prije i nakon leukaferoze, broj ukupno sakupljenih stanica i faktor novačenja za leukocite, mononuklearne stanice, CD34+ stanice, granulocite i trombocite prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija*

Vrsta stanica	Prije leukaferoze	Nakon leukaferoze	Ukupan broj sakupljenih stanica	Faktor novačenja
Leukociti x10 <sup>8</sup>	676,70 ±416,73	527,36 ±368,78	439,69 ±156,81	<b>1,64</b> ±0,54
Mononuklearne stanice x10 <sup>8</sup>	96,32 ±45,07	46,56 ±20,49	205,47 ±103,26	<b>2,72</b> ±0,69
Granulociti x10 <sup>8</sup>	580,37 ±385,53	480,79 ±355,94	234,21 ±137,95	<b>1,42</b> ±0,51
CD34+ x10 <sup>6</sup>	226,80 ±204,88	83,37 ±68,77	540,12 ±562,95	<b>3,23</b> ±1,61
Trombociti x10 <sup>9</sup>	469,47 ±210,93	227,70 ±87,77	313,72 ±183,12	<b>1,17</b> ±0,20

Mononuklearnih stanica je sakupljeno 2,72±0,69 puta više od ukupnog broja koji je bio dostupan u perifernoj krvi prije početka leukaferoze, što ukazuje da tijekom leukaferoze dolazi do novačenja mononuklearnih stanica u perifernu krv.

Leukocita je sakupljeno 1,64±0,54 puta, granulocita 1,42±0,51 puta, a trombocita 1,17±0,20 puta više od ukupnog broja koji je bio dostupan u perifernoj krvi prije početka leukaferoze što ukazuje da tijekom leukaferoze ne dolazi do dodatnog otpuštanja ovih stanica u perifernu krv.

#### **4.9. Subpopulacije CD34+ stanica u produktu leukaferoze**

Subpopulacije CD34+ stanica u produktu sakupljenom tijekom obrade 4 ukupna volumena krvi bolesnika (UVK 1234) te tijekom obrade 5. i 6. ukupnog volumena krvi (UVK 56) prikazane su u tablici 13. Nije nađena statistički značajna razlika niti u i jednoj subpopulaciji CD34+ stanica u produktu leukaferoze sakupljenom tijekom standardne obrade 4 volumena krvi bolesnika u

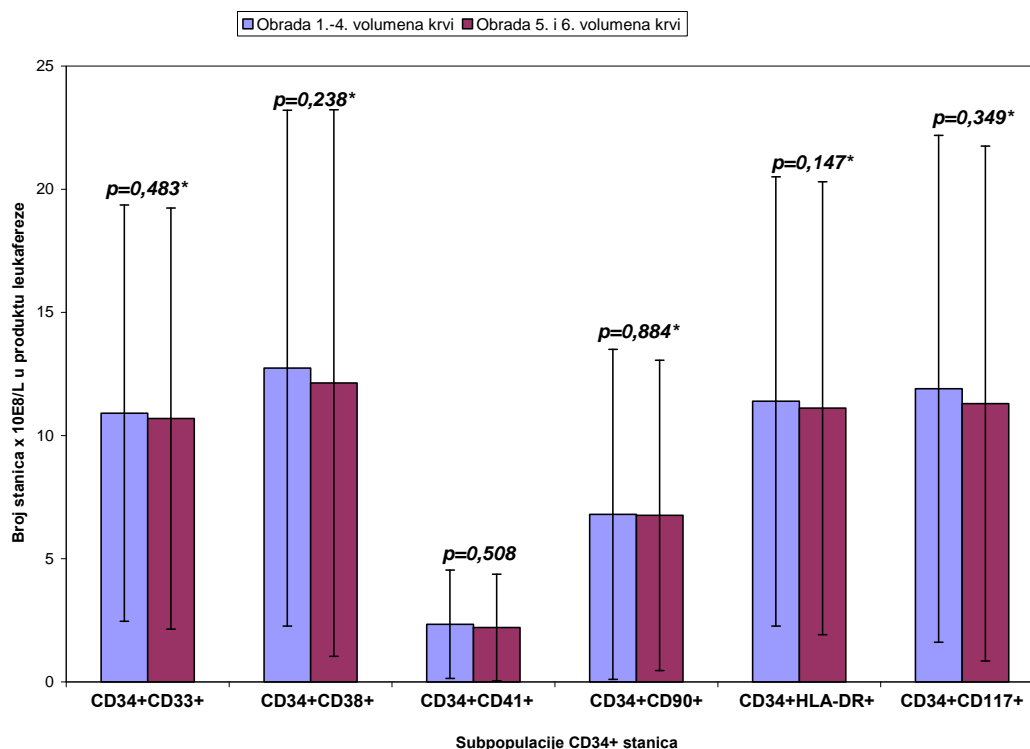
odnosu na produkt sakupljen tijekom obrade dodatnog 5. i 6. volumena krvi (*t*-test za zavisne uzorke).

Tablica 13. Subpopulacije CD34+ stanica u produktu leukaferenze sakupljenom tijekom obrade 4 ukupna volumena krvi bolesnika (UVK 1234) te obrade 5. i 6. ukupnog volumena krvi (UVK 56) prikazane su kao aritmetička sredina±standardna devijacija

Subpopulacije CD34+ stanica	(UVK1234) 1.-4. ukupan volumen krvi	(UVK56) 5. i 6. ukupan volumen krvi	<i>p</i> *
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L	163,95±82,34	158,77±66,31	0,600
CD38+ (% CD34+ st.)	98,90±2,33	99,07±1,67	0,669
CD34+CD38+ (% leukocita)	0,83±0,68	0,77±0,66	0,152
CD34+CD38+ (x10 <sup>8</sup> /L)	12,74±10,47	12,13±11,09	0,238
HLA-DR+ (% CD34+ st.)	98,67±1,84	99,02±1,30	0,100
CD34+HLA-DR+ (% leukocita)	0,78±0,62	0,75±0,53	0,219
CD34+HLA-DR+ (x10 <sup>8</sup> /L)	11,90±10,29	11,30±10,45	0,147
CD90+ (% CD34+ st.)	46,69±19,77	47,72±20,82	0,320
CD34+CD90+ (% leukocita)	0,42±0,43	0,41±0,43	0,460
CD34+CD90+ (x10 <sup>8</sup> /L)	6,80±6,7	6,76±6,3	0,884
CD117+ (% CD34+ st.)	94,15±4,75	94,48±4,64	0,529
CD34+CD117+ (% leukocita)	0,75±0,61	0,72±0,57	0,170
CD34+CD117+ (x10 <sup>8</sup> /L)	11,39±9,12	11,12±9,19	0,349
CD41+ (% CD34+ st.)	21,97±19,28	19,74±20,09	0,080
CD34+CD41+ (% leukocita)	0,16±0,14	0,16±0,16	0,745
CD34+CD41+ (x10 <sup>8</sup> /L)	2,34±2,20	2,21±2,16	0,508
CD33+ (% CD34+ st.)	89,10±13,49	89,52±12,33	0,416
CD34+CD33+ (% leukocita)	0,72±0,60	0,69±0,58	0,242
CD34+CD33+ (x10 <sup>8</sup> /L)	10,91±8,44	10,68±8,55	0,483

\**t*-test za zavisne uzorke

Subpopulacije CD34<sup>+</sup> stanica ( $\times 10^8/L$ ) u produktu leukaferenze sakupljenom tijekom obrade prva 4 volumena krvi bolesnika (UVK 1234) i obrade 5. i 6. volumena krvi (UVK 56) prikazane su dvostrukim stupcima na slici 25.



Slika 25. Subpopulacije CD34<sup>+</sup> stanica  $\times 10^8/L$  (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) u produktu leukaferenze sakupljenom tijekom standardne obrade 4 volumena krvi bolesnika te dodatne obrade 5. i 6. volumena krvi  
\**t*-test za zavisne uzorke

#### 4.10. Brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih postupkom leukaferenze

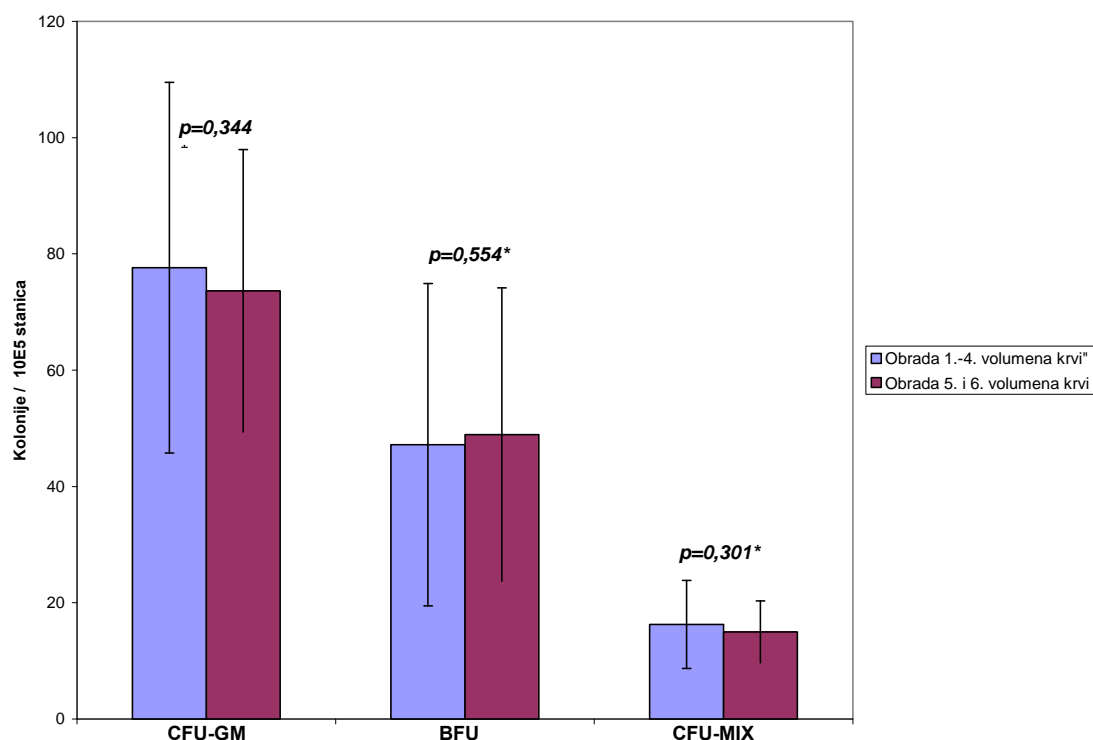
Broj CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih postupkom leukaferenze tijekom standardne obrade 4 volumena krvi bolesnika, odnosno obrade 5. i 6. volumena krvi prikazane su u tablici 14. Nije nađena statistički značajna razlika niti u jednoj vrsti analiziranih kolonija uzgojenih iz produkta leukaferenze sakupljenih tijekom standardne obrade 4 ukupna volumena u odnosu na produkt sakupljen tijekom obrade 5. i 6. volumena krvi (*t*-test za zavisne uzorke).

Tablica 14. Brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih obradom ukupno 4 volumena krvi u odnosu na obradu 5. i 6. volumena krvi prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

Broj kolonija /10 <sup>5</sup> stanica	1.-4. ukupan volumen krvi (UVK1234)	5. i 6. ukupan volumen krvi (UVK56)	<i>p</i> *
CFU-GM	77,63 $\pm$ 31,88	73,65 $\pm$ 24,27	0,344
BFU	47,19 $\pm$ 27,72	48,94 $\pm$ 25,23	0,558
CFU-MIX	16,28 $\pm$ 7,57	15 $\pm$ 5,31	0,301

\**t*-test za zavisne uzorke

Brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih tijekom obrade 4 ukupna volumena krvi te obrade 5. i 6. volumena krvi prikazana je dvostrukim stupcima na slici 26.



Slika 26. Brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija (aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija) nakon kratkotrajnog uzgoja stanica sakupljenih postupkom leukaferenze tijekom standardne obrade 4 volumena krvi bolesnika u odnosu na obradu 5. i 6. volumena krvi

\**t*-test za zavisne uzorke

#### 4.11. Mikrobiološka analiza produkta leukaferoze

Mikrobiološkom analizom utvrđena je sterilnost svih sakupljenih produkata leukaferoze.

#### 4.12. Neželjene reakcije

Svi bolesnici su postupak leukaferoze dobro podnjeli pa niti jedan postupak nije bio prekinut prije planiranog vremena. Samo u jedne bolesnice u koje je vrijednost kalcija već prije početka leukaferoze bila niža od normale (1,9 mmol/L) na samom početku leukaferoze javili su se blagi trnci u usnama (stupanj 1.) koji su odmah nestali nakon ubrzanja infuzije kalcija.

#### 4.13. Vrijednosti elektrolita prije i nakon leukaferoze

Vrijednosti elektrolita kalija, kalcija, magnezija, fosfata, natrija i klorida prije i nakon postupka leukaferoze, kao i postotak smanjenja vrijednosti elektrolita od početne vrijednosti prikazane su u tablici 15.

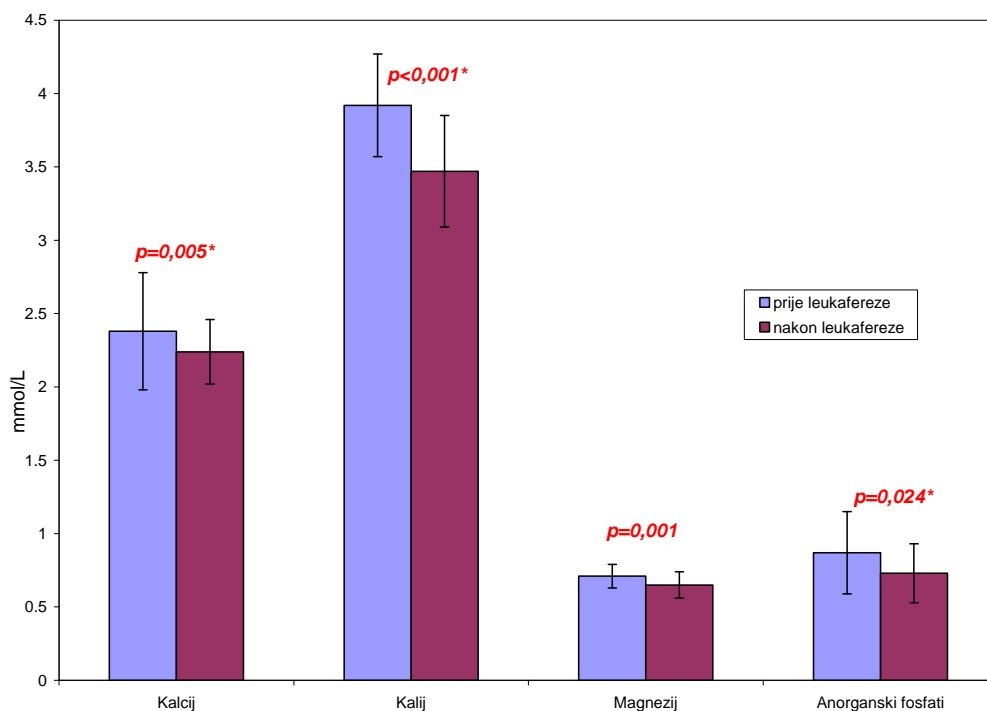
*Tablica 15. Vrijednosti elektrolita u perifernoj krvi bolesnika prije i nakon postupka leukaferoze te postotak smanjenja u odnosu na vrijednosti elektrolita od početne vrijednosti prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija*

Elektrolit	Prije leukaferoze	Nakon leukaferoze	<i>p</i> *	Postotak smanjenja
Kalcij (mmol/L)	2,38 ± 0,40	2,24 ± 0,22	0,005	5,18 ± 4,10
Kalij (mmol/L)	3,92 ± 0,35	3,47 ± 0,38	<0,001	11,75 ± 7,46
Magnezij (mmol/L)	0,71 ± 0,08	0,65 ± 0,09	0,001	11,98 ± 5,44
Anorg. fosfati(mmol/L)	0,87 ± 0,28	0,73 ± 0,2	0,024	17,22 ± 16,06
Natrij (mmol/L)	143,00 ± 2,57	146,27 ± 2,72	0,188	0,69 ± 0,64
Kloridi (mmol/L)	100,3 ± 2,73	99,8 ± 3,19	0,760	0,07± 0,03

\* *t*-test za zavisne uzorke



Vrijednosti elektrolita kalcija, kalija, magnezija i anorganskih fosfata u perifernoj krvi prije i nakon postupka leukaferenze prikazane su dvostrukim stupcima na slici 27.



*Slika 27. Vrijednosti elektrolita kalcija, kalija, magnezija i anorganskih fosfata u perifernoj krvi prije i nakon postupka leukaferenze (aritmetička sredina ± standardna devijacija)  
\*t-test za zavisne uzorke*

Iako su vrijednosti kalcija u perifernoj krvi nakon leukaferenze bile statistički značajno niže nego prije početka leukaferenze, one su i dalje ostale unutar referentnog intervala ( $p=0,005$ , *t-test za zavisne uzorke*). Vrijednosti kalija, magnezija i anorganskog fosfata koje su nakon leukaferenze bile značajno niže nego prije početka leukaferenze smanjile su se ispod referentnog intervala (*t-test za zavisne uzorke*). Niti u jednog bolesnika nisu zabilježeni ni neurološki niti kardiološki simptomi koji bi pratili promjene vrijednosti elektrolita.

#### 4.14. Vrijednosti koagulacijskih pokazatelja prije i nakon leukaferoze

U svim leukaferozama je za sprječavanje zgrušavanja krvi korištena kombinacija otopine citrata i heparina. Zbog toga su i analizirana dva koagulacijska pokazatelja: protrombinsko vrijeme i APTV (tablica 16). Nakon leukaferoze došlo je do značajnog sniženja vrijednosti protrombinskog vremena koje je ipak ostalo unutar referentnog intervala. Vrijednosti APTV-a su nakon leukaferoze bile produžene izvan referentnog intervala.

*Tablica 16. Vrijednosti protrombinskog vremena (PV) i aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) prije i nakon postupka leukaferoze (aritmetička sredina ± standardna devijacija)*

Laboratorijski pokazatelj	Prije leukaferoze	Nakon leukaferoze	<i>p</i> *
PV	0,97 ± 0,13	0,85 ± 0,15	<0,001
APTV	29,15 ± 8,39	45,25 ± 21,95	0,004

\**t*-test za zavisne uzorke

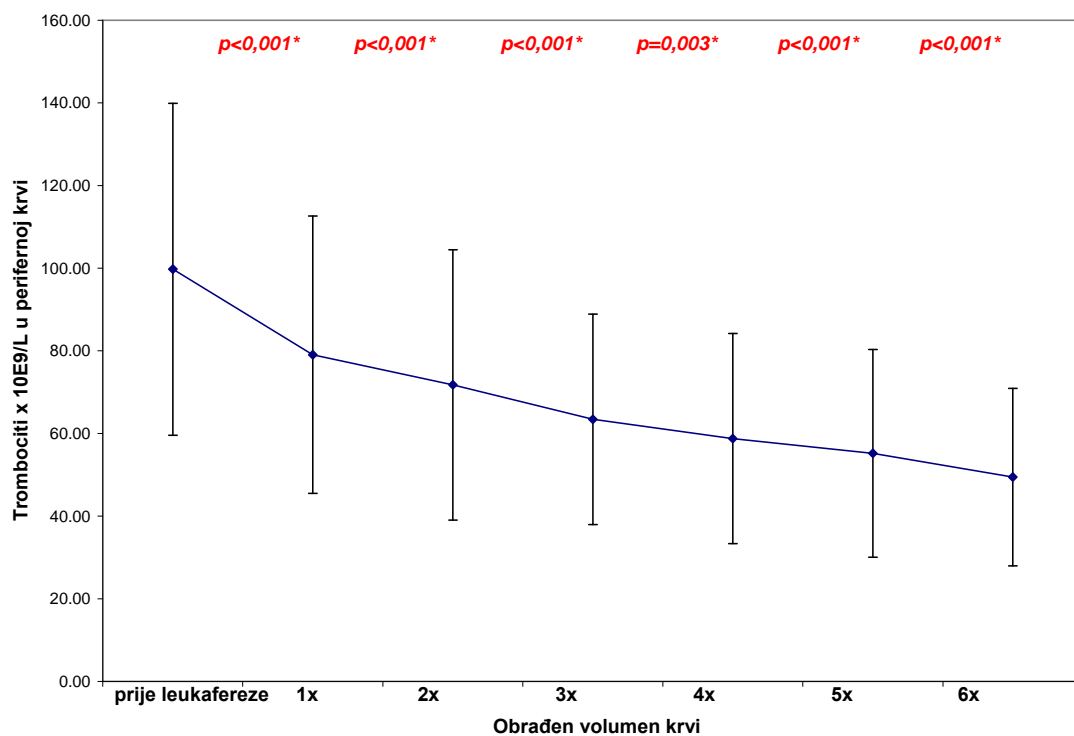
Broj trombocita u perifernoj krvi te postotak smanjenja trombocita u odnosu na broj prije leukaferoze prikazane su u tablici 17.

*Tablica 17. Broj trombocita u perifernoj krvi prije i tijekom postupka leukaferoze te postotak smanjenja trombocita u odnosu na broj prije leukaferoze (TR100) prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija*

	Prije leukaferoze	Obraden volumen krvi					
		1x	2x	3x	4x	5x	6x
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L	99,75 ±40,17	79,06 ±33,55	71,75 ±32,69	63,41 ±25,46	58,75 ±25,41	55,20 ±25,14	49,44 ±21,46
TR100 (%)	100	79,26 ±9,06	72,24 ±12,73	64,55 ±11,23	59,88 ±13,61	56,65 ±16,21	51,65 ±15,89

Dinamika promjene broja trombocita u perifernoj krvi tijekom leukaferoze prikazana je linijskim grafikonom (slika 28). Pronađena je statistički značajna promjena broja trombocita u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka

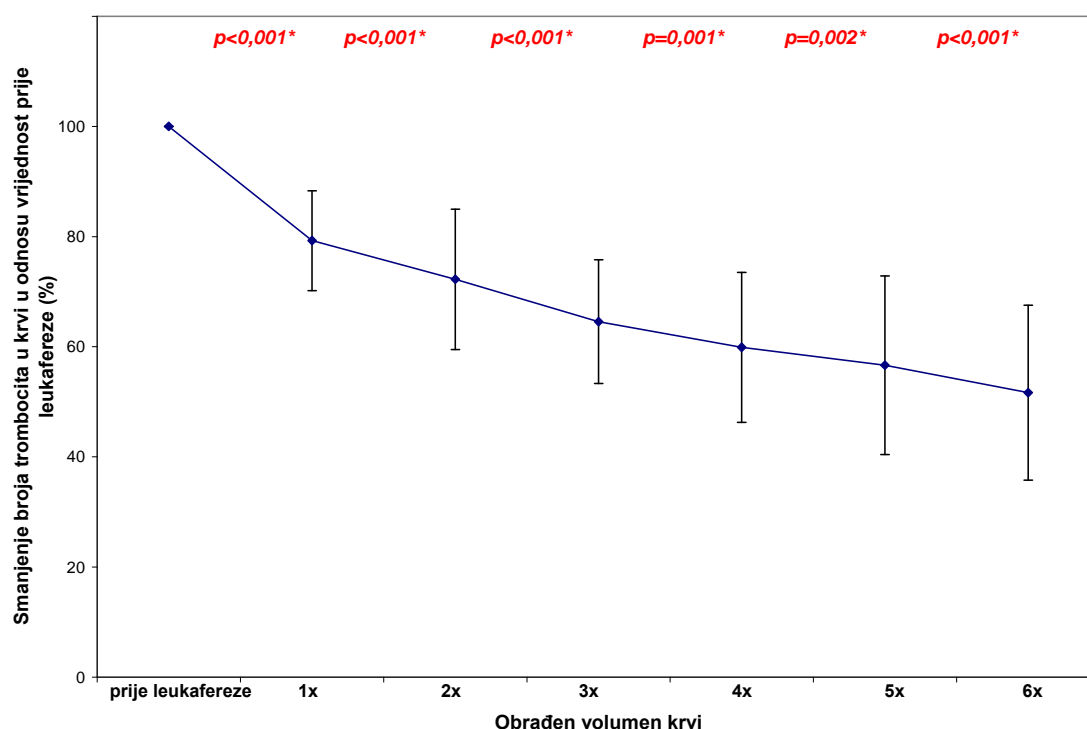
( $F_{6,150}=62,312$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja broja trombocita u perifernoj krvi opaženog između svih mjernih točaka ( $p<0,001$ , *t-test za zavisne uzorke*). Nije pronađena statistički značajna interakcija između promjene broja trombocita u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,150}=0,568$ ,  $p=0,755$ , *višestruka analiza varijance*), kao ni između promjene broja trombocita i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,150}=1,953$ ,  $p=0,054$ , *višestruka analiza varijance*) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 28. Dinamika promjene broja trombocita (aritmetička sredina ± standardna devijacija) u perifernoj krvi prije i tijekom leukaferenze ( $F_{6,150}=62,312$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\**t-test za zavisne uzorke*

Dinamika smanjenja broja trombocita (%) tijekom leukaferenze u odnosu na vrijednost prije leukaferenze prikazana je linijskim grafikonom (Slika 29.) Pronađena je statistički značajno smanjenje broja trombocita u odnosu na početne vrijednosti u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,150}=130,902$ ,

$p < 0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja opaženog između svih mjernih točaka ( $p < 0,001$ , *t-test za zavisne uzorke*). Nije pronađena statistički značajna interakcija između smanjenja broja trombocita u odnosu na početne vrijednosti u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,150}=0,605$ ,  $p=0,726$ , *višestruka analiza varijance*), kao ni između smanjenja i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,150}=0,617$ ,  $p=0,716$ , *višestruka analiza varijance*) te su zbog toga rezultati prikazani skupno za sve bolesnike.



Slika 29. Dinamika promjene broja trombocita tijekom leukafereze u odnosu na vrijednost prije početka leukafereze (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) ( $F_{6,150}=130,902$ ,  $p < 0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja)  
\**t-test za zavisne uzorke*

Profilaktičku transfuziju trombocita prije leukafereze primio je samo jedan bolesnik u kojeg je broj trombocita prije afereze bio manji od  $30 \times 10^9/L$ . Unatoč obradi velikog volumena krvi, broj trombocita nakon leukafereze bio je u svih bolesnika viši od  $20 \times 10^9/L$  pa niti u jednog bolesnika nije bilo potrebno transfuzijsko liječenje.

#### 4.15. Vrijednosti hematokrita prije i nakon leukaferoze

Vrijednosti hematokrita u perifernoj krvi te postotak smanjenja hematokrita u odnosu na vrijednosti prije leukaferoze prikazane su u tablici 18.

Tablica 18. Vrijednosti hematokrita u perifernoj krvi prije i tijekom postupka leukaferoze te postotak smanjenja hematokrita u odnosu na vrijednosti prije leukaferoze (Htc100) prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

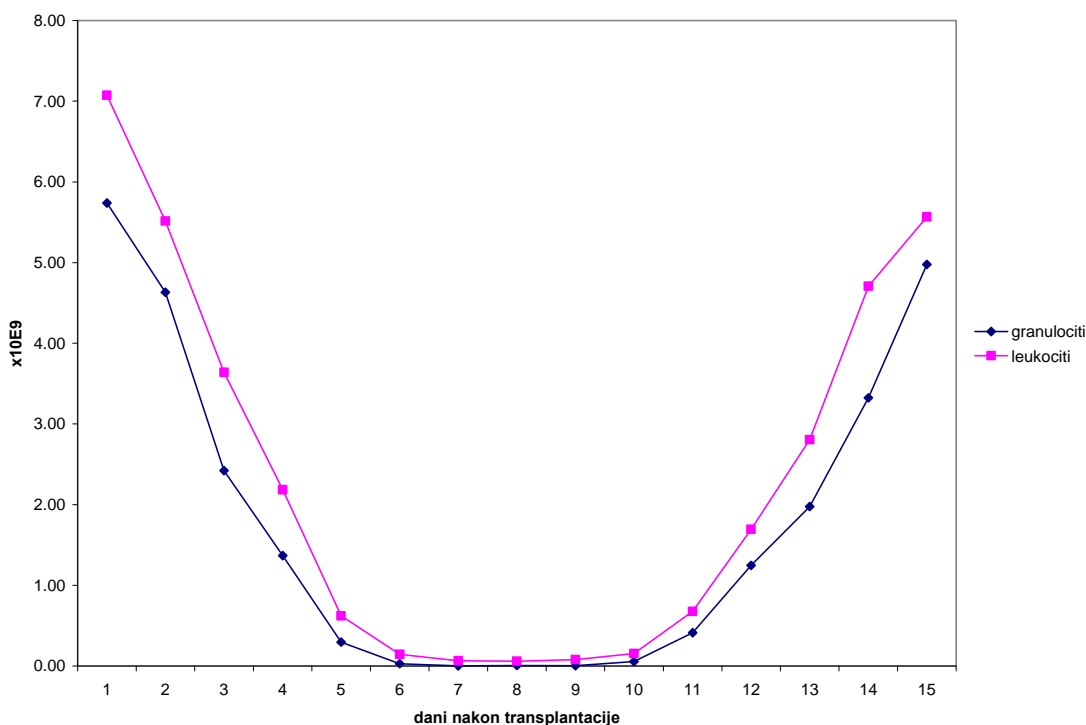
	Prije leukaferoze	Obrađen volumen krvi					
		1	2	3	4	5	6
Hematokrit (%)	31,37 $\pm 4,69$	27,58 $\pm 4,13$	27,27 $\pm 4,18$	27,06 $\pm 4,11$	26,96 $\pm 4,24$	26,75 $\pm 4,26$	26,93 $\pm 4,14$
Htc100 (%)	100	88,01 $\pm 4,78$	87,00 $\pm 4,93$	86,36 $\pm 4,81$	86,01 $\pm 5,37$	85,32 $\pm 5,77$	85,94 $\pm 5,25$

Tijekom leukaferoze opažen je značajan pad hematokrita u perifernoj krvi bolesnika ( $F_{6,150}=76,732$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Nađena je statistički značajna promjena hematokrita u perifernoj krvi kroz sedam mjernih točaka ( $F_{6,150}=130,902$ ,  $p<0,001$ , analiza varijance za ponavljana mjerenja). Post-hoc usporedbom uočilo se da je ta razlika rezultat statistički značajnog smanjenja hematokrita jedino nakon obrade prvog volumena krvi u odnosu na početne vrijednosti ( $p<0,001$ ,  $t$ -test za zavisne uzorke). U daljnjem tijeku leukaferoze nije bilo promjene u vrijednost hematokrita. Nije pronađena statistički značajna interakcija između promjene hematokrita u perifernoj krvi i dijagnoze ( $F_{6,150}=0,985$ ,  $p=0,438$ , višestruka analiza varijance), kao ni između promjene hematokrita i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv ( $F_{6,150}=2,651$ ,  $p=0,018$ , višestruka analiza varijance). Unatoč statistički značajnom smanjenju vrijednosti hematokrita, to sniženje nije bilo klinički značajno. Niti jedan bolesnik nakon leukaferoze nije zahtijevao transfuziju eritrocita.

#### 4.16. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica i oporavak funkcije krvotvornog sustava

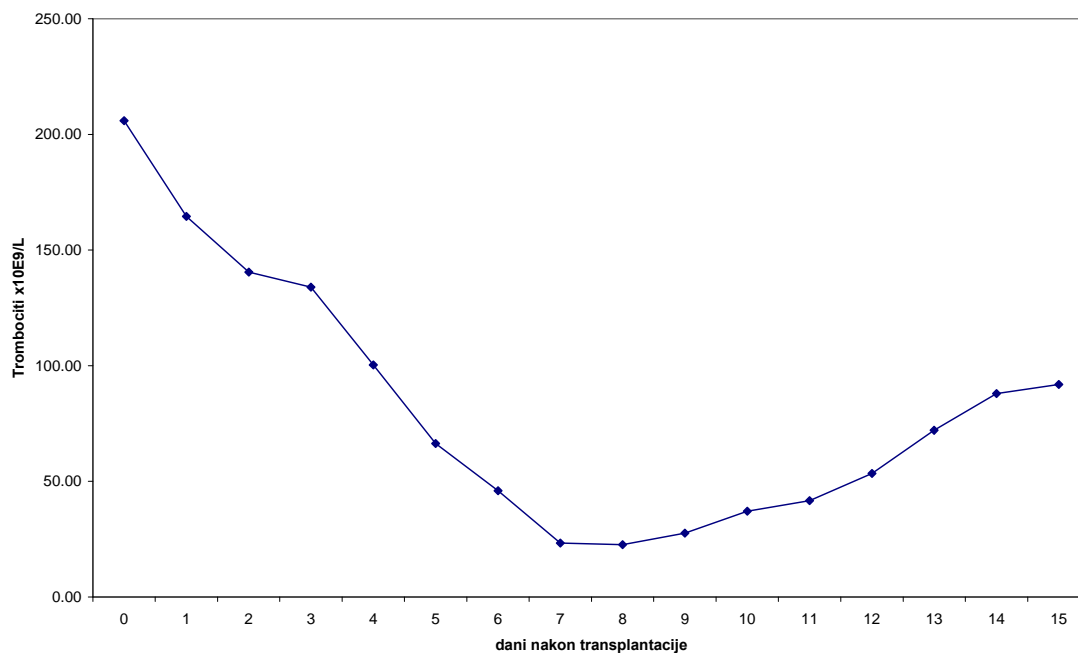
Dvadeset šest (86,7%) bolesnika je transplantirano s KMS sakupljenim postupkom leukaferenze. Kod 12 (40%) bolesnika učinjena je dvostruka transplantacija.

Prije transplantacije, bolesnici s multiplim mijelomom su primili visoke doze melfalana,<sup>114</sup> a bolesnici s limfomom kemoterapiju BEAM.<sup>116</sup> U transplantatu KMS prosječno je bilo  $4,74 \pm 1,49$  CD34+ stanica/kg TT. Dva bolesnika su transplantirana koncentratom CD34+ stanica koji je iz produkta leukaferenze izdvojen imunomagnetskom selekcijom. U svih transplantiranih bolesnika došlo je do oporavka funkcija krvotvornog sustava. Linijskim grafikonom (Slika 30.) prikazan je hematološki oporavak leukocita i granulocita nakon transplantacije KMS. Broj leukocita veći od  $1 \times 10^9/L$  dosegnut je  $11,69 \pm 1,83$  dan, a granulocita veći od  $0,5 \times 10^9/L$   $12,08 \pm 2,11$  dan.



Slika 30. Hematološki oporavak broja leukocita  $\times 10^9/L$  i granulocita  $\times 10^9/L$  (aritmetička sredina) u perifernoj krvi bolesnika nakon transplantacije KMS

Linijskim grafikonom (Slika 31.) prikazan je hematološki oporavak trombocita nakon transplantacije KMS. Broj trombocita veći od  $20 \times 10^9/L$  dosegnut je  $11,19 \pm 1,33$  dan, a veći od  $50 \times 10^9/L$   $12,92 \pm 1,73$  dan.



*Slika 31. Hematološki oporavak broja trombocita  $\times 10^9/L$  (aritmetička sredina) u perifernoj krvi bolesnika nakon transplantacije KMS*

## 5. RASPRAVA

Iako se KMS iz periferne krvi postupkom leukaferoze sakupljaju već 20 godina, ipak se još uvijek istražuju mogućnosti za njeno unapređenje. Posljednjih je godina, jedan dio istraživanja usmjeren na pronalaženje novih agenasa za mobilizaciju KMS u krv te precizniju evaluaciju KMS (ne samo njenog biljega CD34+), dok je drugi dio usmjeren na unapređenje tehnike sakupljanja KMS postupkom leukaferoze. Razvoj novih u potpunosti automatiziranih separatora ima za cilj unaprijediti učinkovitost izdvajanja KMS iz krvi i smanjiti utjecaj ljudskih faktora kao što su znanje i iskustvo operatera na uspješnost sakupljanja. Mogući pristup poboljšanju tehnike sakupljanja je obrada velikog volumena krvi u samo jednom postupku leukaferoze, tzv. leukaferoza velikog volumena krvi (LVV). Pod tim se podrazumjeva obrada ukupnog bolesnikovog volumena krvi više od 3 puta u jednom postupku leukaferoze. Za LVV se smatra da može smanjiti broj postupaka leukaferoze potrebnih za pribavljanje transplantata KMS te da može povećati vjerojatnost sakupljanja dovoljnog broja KMS i u bolesnika koji loše mobiliziraju KMS.

Usporedba rezultata dosadašnjih istraživanja LVV je otežana budući da su provedena na heterogenim skupinama bolesnika s obzirom na dijagnozu, prethodno liječenje i protokol mobilizacije KMS, s različitim vrstama staničnih separatora, a i sam postupak LVV još uvijek nije standardiziran. Iako svi stanični separatori djeluju na istom principu izdvajanja stanica raslojenih centrifugiranjem krvi, ipak svi oni imaju svoje osobitosti, a posebice različitu učinkovitost izdvajanja CD34+ stanica. Usporedbu rezultata osobito otežava činjenica što obrađeni volumen krvi nije uvijek izražen kao broj koliko je puta obrađen ukupan volumen krvi, već kao apsolutni volumen obrađene krvi bolesnika. Stoga su primjerice neki autori LVV definirali kao obradu 12 L krvi, što ovisno o tjelesnim proporcijama bolesnika može za različite bolesnike iznositi 2 ili 3 ukupna volumena krvi.

S ciljem prevladavanja navedenih nedostataka, u ovom je istraživanju prospektivno praćena homogena skupina bolesnika s obzirom na dijagnozu.



Većinom su to bili bolesnici s multiplim mijelomom, skupina kod koje je cilj sakupiti dovoljan broj stanica za dvije transplantacije pa je primjena LVV u njih osobito prikladna. Osim toga, obrađen volumen krvi u svakoj leukaferenzi bio je konstantan u smislu da je svakom bolesniku ukupni volumen krvi obrađen 6 puta. Obrada velikog volumena krvi postignuta je na dva načina: a) udvostručenjem ulaznog protoka krvi u separator što je omogućilo i obradu dvostruko veće količine krvi, i b) produženjem trajanja postupka na prosječno 5 sati. Iako bi se trajanje leukaferenze vjerojatno moglo još produžiti, u ovom istraživanju ono je bilo ograničeno na prosječno 5 sati kako zbog bolesnikove udobnosti i tolerancije dugotrajnog postupka, tako i zbog sukladnosti s organizacijom rada odjela za aferezu, laboratorija za kontrolu kvalitete produkta i odjela za zamrzavanje transplantata. Sakupljanje produkta leukaferenze uzastopno u 6 vrećica od kojih se u svakoj nalaze stanice sakupljene tijekom obrade jednog ukupnog volumena bolesnikove krvi jest pogodan model za ispitivanje dinamike prinosa i učinkovitosti sakupljanja CD34+ ovisno o vremenu i volumenu obrađene krvi. Valja još istaknuti da su u ovom istraživanju, za razliku od dosadašnjih, sveobuhvatno praćeni pokazatelji uspješnosti sakupljanja i to dinamika promjene pokazatelja u krvi i produktu leukaferenze tijekom postupka, kao i kvaliteta sakupljenih stanica. Također su istodobno praćeni i pokazatelji koji su važni za sigurnost bolesnika tijekom ovog dugotrajnog postupka.

### **5.1. Osvrt na rezultate provedenog istraživanja leukaferenze velikog volumena**

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da je sakupljanje KMS postupkom LVV učinkovit i siguran postupak. Obradom ukupnog volumena krvi bolesnika 6 puta postupkom LVV koji je trajao  $305,9 \pm 7,63$  minuta sakupljeno je  $4,71 \pm 3,79 \times 10^6$ /kg TT CD34+ stanica. Nađena je visoka povezanost između broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije afereze i prinosa CD34+ stanica. Prinos CD34+ stanica bio je (očekivano) statistički značajno veći kod dobrih mobilizatora. Kumulativni prinos CD34+ stanica /kg TT se nakon obrade svakog

dodatnog volumena krvi značajno povećavao u odnosu na prethodnu točku mjerenja tijekom cijelog postupka LVV.

Usporedba prinosa CD34+ stanica tijekom obrade ukupno 4 volumena krvi u odnosu na obradu ukupno 6 volumena krvi pokazala je da je prinos CD34+ stanica statistički značajno veći kod postupka LVV. Tijekom obrade 4 ukupna volumena krvi prikupljen je transplantat tj. više od  $3,5 \times 10^6/\text{kgTT}$  CD34+ stanica kod 9 (30,0 %) bolesnika, dok je tijekom obrade 6 ukupnih volumena krvi kod tih istih bolesnika transplantat prikupljen u 20 (63,7%) slučajeva, što je statistički značajno više. Budući da je u bolesnika s multiplim mijelomom planirano liječenje dvostrukom transplantacijom, dodatno je analizirano kod koliko njih je postupkom LVV sakupljeno  $\geq 7 \times 10^6/\text{kgTT}$  CD34+ stanica što je dostatno za dvostruku transplantaciju. Obradom 4 volumena krvi standardnim postupkom leukaferenze u 6 (30%) bolesnika s multiplim mijelomom bi bio sakupljen jedan transplantat, a samo bi kod još jednog (5%) bolesnika bila sakupljena dva transplantata. Produživanjem leukaferenze i obradom ukupno 6 volumena krvi je u 9 (45%) bolesnika sakupljen jedan transplantat, a čak kod još 6 (30%) bolesnika dva transplantata.

Tijekom leukaferenze u perifernoj krvi dolazi do postupnog smanjenja vrijednosti svih promatranih pokazatelja: broja leukocita, postotka i broja mononuklearnih stanica, postotka i broja CD34+ stanica, a statistički značajno smanjenje bilo je najizraženije nakon obrade prvog volumena krvi. Nakon završetka leukaferenze broj CD34+ stanica u perifernoj krvi smanjio se na 45,9% u odnosu na vrijednosti prije leukaferenze.

Tijekom LVV dolazi do statistički značajne promjene prinosa leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica. Prinos CD34+ stanica je značajno manji samo u 1. vrećici u koju su sakupljene stanice tijekom obrade prvog volumena krvi, dok u slijedećim vrećicama nema značajne promjene prinosa. Valja istaći ovu stabilnost prinosa CD34+ stanica tijekom cijele leukaferenze, što je od osobite važnosti jer se unatoč smanjenju broja CD34+ stanica u perifernoj krvi u odnosu na vrijednosti prije

leukaferenze tijekom cijelog postupka prikuplja ista količina CD34+ stanica.

Ukupna učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica postupkom LVV iznosila je  $70,9 \pm 33,21\%$ . Tijekom obrade prvog volumena krvi učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica statistički je značajno manja u odnosu na obradu ostalih volumena krvi, a u daljnjem tijeku LVV učinkovitost se postupno povećava.

Postupkom LVV sakupljeno je  $3,23 \pm 1,61$  puta više CD34+ stanica od ukupnog broja stanica koje su bile dostupne u perifernoj krvi prije početka leukaferenze, što ukazuje da tijekom leukaferenze dolazi do dodatnog novačenja CD34+ stanica iz koštane srži u perifernu krv. Kod bolesnika koji su lošije mobilizirali CD34+ stanice faktor novačenja ( $4,14 \pm 0,49$ ) je bio značajno veći nego kod dobrih mobilizatora ( $2,84 \pm 0,37$ ) bez obzira na njihovu dijagnozu.

Usporedba kvalitete produkta leukaferenze sakupljenog tijekom obrade ukupno 4 volumena krvi s produktom sakupljenim tijekom produljenja obrade još dva dodatna volumena krvi nije pokazala razliku niti u subpopulacijama CD34+ stanica niti u brojnosti CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja kulture stanica. Ovi rezultati upućuju da je kvaliteta produkta leukaferenze nepromijenjena tijekom cijelog postupka obrade velikog volumena krvi te da dodatna obrada krvi ne utječe na kvalitetu sakupljenih stanica.

Svi bolesnici su postupak LVV dobro podnijeli pa niti jedan postupak nije bio prekinut prije planiranog vremena. Budući da se zbog infuzije otopine citrata mogla očekivati pojava hipokalcemije, svi bolesnici su parenteralno primali kontinuiranu nadoknadu kalcija. Unatoč toj infuziji vrijednosti kalcija u krvi su nakon završetka leukaferenze bile značajno niže, ali i dalje su ostale unutar referentnog intervala. Vrijednosti kalija, magnezija i anorganskog fosfata su se nakon leukaferenze smanjile ispod referentnog intervala. Niti u jednog bolesnika nisu zabilježeni klinički simptomi koji bi pratili promjene vrijednosti elektrolita.

Budući da bolesnici tijekom LVV primaju kombinaciju velike količine antikoagulantne otopine citrata i heparina dolazi do promjene u pokazateljima koagulacije. Nakon leukaferenze došlo je do značajne promjene vrijednosti protrombinskog vremena i APTV-a. Unatoč opaženih promjena koagulacijskih

parametara niti u jednog bolesnika nisu se javili znakovi hemoragične dijateze. Broj trombocita u perifernoj krvi se statistički značajno smanjivao tijekom cijelog postupka leukaferoze, a nakon završetka leukaferoze broj trombocita u krvi iznosio je  $51,65 \pm 15,89\%$  od početne vrijednosti. Valja naglasiti da je broj trombocita nakon leukaferoze bio je u svih bolesnika viši od  $20 \times 10^9/L$  i niti u jednog bolesnika nije bilo potrebe za transfuzijskim liječenjem.

Tijekom leukaferoze opažen je značajan pad hematokrita u krvi bolesnika samo nakon obrade prvog volumena krvi, a nakon završetka leukaferoze vrijednost hematokrita iznosila je  $85,94 \pm 5,25\%$  od početne vrijednosti. Smanjenje vrijednosti hematokrita nije bilo klinički značajno pa niti jedan bolesnik nakon leukaferoze nije trebao transfuziju eritrocita.

Postupkom LVV može se učinkovito sakupiti dovoljan broj stanica za uspješnu transplantaciju KMS što potvrđuje pravovremeni hematološki oporavak svih bolesnika transplantiranih s KMS sakupljenim obradom velikog volumena krvi.

## **5.2. Leukaferoza velikog volumena i prinos CD34+ stanica**

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je sakupljanje KMS postupkom leukaferoze velikog volumena krvi učinkovit i siguran postupak. Obradom ukupnog volumena krvi 6 puta postupkom leukaferoze koji je trajao  $305,9 \pm 7,63$  minuta sakupljeno je ukupno  $4,71 \pm 3,79 \times 10^6/kg$  TT CD34+ stanica. Kod dobrih je mobilizatora očekivano sakupljen veći prinos CD34+ stanica nego kod lošijih mobilizatora, dok nije bilo razlike u prinosu CD34+ stanica između bolesnika s multiplim mijelomom i limfomom. Istraživanja Humpe i sur., kao i istraživanje Forda i sur. su pokazala veći prinos CD34+ stanica i CFU-GM u bolesnika koji su mobilizirali više CD34+ stanica u perifernu krv.<sup>90, 122</sup>

Između ukupnog prinosa CD34+ stanica i broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije afereze nađena je značajna linearna korelacija. Brojna su istraživanja također opisala linearnu korelaciju i pokazala da je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi najbolji prediktor prinosa CD34+stanica.<sup>61, 123-125</sup> Jedino su

Smolowicz i sur. kod loših mobilizatora našli značajnu korelaciju između prinosa broja CD34+ stanica i ukupnog volumena obrađene krvi (>16 L), a ne broja CD34+ stanica u krvi prije leukaferze.<sup>104</sup> Kod dobrih su mobilizatora i oni našli da prinos CD34+ stanica ovisi o broju CD34+ stanica u krvi prije leukaferze. Međutim, kada se izjednači volumen obrađene krvi, kao što je učinjeno u ovom istraživanju, prinos CD34+ stanica u prvom redu ovisi o broju CD34+ stanica u krvi prije leukaferze bez obzira na stupanj mobilizacije KMS.

Kumulativni se prinos CD34+ stanica/kg TT nakon obrade svakog dodatnog volumena krvi značajno povećavao kroz svih šest mjernih točaka u odnosu na prethodnu točku mjerenja tijekom cijelog postupka LVV. Iako je prinos bio značajno veći u dobrih mobilizatora, ipak je porast kumulativnog prinosa bio jednak kod svih bolesnika bez obzira na stupanj mobilizacije i dijagnozu. Drugi su autori također pronašli porast kumulativnog prinosa CD34+ stanica: Smolowicz i sur. tijekom obrade tri volumena krvi, Humpe i sur. tijekom obrade četiri volumena krvi, a Bojko i sur. tijekom obrade pet volumena krvi.<sup>100, 101, 105</sup>

### **5.3. Dinamika promjene broja stanica u perifernoj krvi tijekom leukaferze velikog volumena**

Tijekom leukaferze u perifernoj krvi dolazi do značajnog smanjenja broja leukocita, postotka i broja mononuklearnih stanica te postotka i broja CD34+ stanica. U ovom je istraživanju praćena dinamika promjene vrijednosti krvnih stanica nakon obrade svakog volumena bolesnikove krvi. Iako se tijekom cijelog postupka LVV vrijednosti svih promatranih pokazatelja u krvi postupno smanjuju, ipak je smanjenje bilo najizraženije nakon obrade prvog volumena krvi. Nakon završetka leukaferze smanjio se broj CD34+ stanica u perifernoj krvi na 45,9% vrijednosti prije leukaferze. Niti u jednog bolesnika u ovom, kao niti u drugim istraživanjima, broj CD34+ stanica u krvi nakon leukaferze nije bio viši nego na početku.<sup>61, 79, 98, 100, 102, 113, 126-128</sup>

Ovakva dinamika promjene broja stanica nađena je u svih bolesnika bez obzira na dijagnozu. Statistički značajna interakcija pronađena je između

promjene broja CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi i stupnja mobilizacije CD34+ stanica u perifernu krv. Kod dobrih mobilizatora dolazi do postupnog smanjenja broja CD34+ stanica tijekom cijelog postupka, dok se kod loših mobilizatora broj CD34+ stanica smanjuje samo nakon obrade prvog volumena krvi nakon čega više nema značajne promjene vrijednosti.

Broj CD34+ stanica ( $\times 10^6/L$ ) u perifernoj krvi se nakon obrade prvog volumena krvi statistički značano smanjio na 63,5 % od početne vrijednosti, da bi se nakon završetka leukaferenze smanjio na 45,9% u odnosu na početni broj CD34+ stanica prije leukaferenze. Nakon LVV broj CD34+ stanica smanjuje se prosječno na polovicu početne vrijednosti što potvrđuju i rezultati drugih istraživanja.<sup>100</sup> U ovom je istraživanju smanjenje bilo značajno veće u dobrih mobilizatora u kojih se broj CD34+ stanica prosječno smanjio na čak 38,30% početne vrijednosti, a u loših na 48,93% početne vrijednosti CD34+ stanica u krvi, a što je u skladu i s rezultatima drugih istraživanja.<sup>61, 79, 98, 102, 113, 126-128</sup> Kako je u ovom istraživanju nakon obrade čak 6 volumena krvi u perifernoj krvi prosječno ostalo 45,9% od početnog broja CD34+ stanica, to upućuje da se CD34+ stanice ni nakon LVV ne iscrpe u cijelosti te da bi se i eventualnim daljnjim produženjem trajanja leukaferenze moglo sakupiti još CD34+ stanica.

Broj CD34+ stanica u krvi najviše se smanjuje na početku leukaferenze.<sup>61, 79, 98, 100, 102, 113, 126-128</sup> Valja istaknuti da na početku leukaferenze ne dolazi samo do smanjenja broja CD34+ stanica, već i svih drugih krvnih stanica - leukocita, mononuklearnih stanica i trombocita. To naglo smanjenje najvjerojatnije je posljedica hemodilucije jer separator na početku postupka uzima punu krv, dok istodobno bolesniku vraća fiziološku otopinu kojom su bile ispunjene cijevi seta separatora. Volumen fiziološke otopine koji se na početku u kratkom vremenu vraća u bolusu u cirkulaciju ovisi o vrsti staničnog separatora, a prosječno iznosi 300 mL. Istodobno se na početku leukaferenze krvne stanice nakupljaju u cijevima seta staničnog separatora što također smanjuje broj CD34+ stanica u krvi. U daljnjem tijeku LVV u dobrih se mobilizatora broj CD34+ stanica postupno, ali ipak značajno smanjuje. Kod loših mobilizatora, broj CD34+ stanica značajno se

smanjuje samo na početku leukaferenze, dok u daljnjem tijeku postupka ne dolazi do značajnog smanjenja što upućuje da se aktiviraju mehanizmi koji nadoknađuju stanice koje je stanični separator izdvojio i sakupio u produktu leukaferenze.<sup>40, 79, 100</sup> U ovom istraživanju, kao i u drugim istraživanjima provedenim u bolesnika mobiliziranih kemoterapijom i G-CSF-om nije opaženo povećanje broja CD34+ stanica u krvi tijekom postupka afereze, a što je opaženo u životinja i zdravih dobrovoljaca koji nisu primali G-CSF.<sup>92, 93, 96, 107</sup> Rowley i sur. smatraju da je ova razlika posljedica toga što je povećanje broja CD34+ stanica u krvi zbog otpuštanja stanica iz koštane srži ili drugih mogućih rezervoara uzrokovano stresom izazvanim leukaferenzom ili infuzijom citrata nadvladano primjenom G-CSF-a.<sup>79</sup>

#### **5.4. Dinamika promjene prinosa i učinkovitosti sakupljanja CD34+stanica tijekom leukaferenze velikog volumena**

Prva istraživanja o LVV koja su provedena u zdravih dobrovoljaca koji nisu primali G-CSF izvjestila su o porastu koncentracije CFU-GM i/ili CD34+ stanica u produktu leukaferenze za 2 do 3 puta većim od početnih vrijednosti i to u slučajevima kad je leukaferenzom obrađeno 17 L krvi.<sup>92, 97</sup> U bolesnika mobiliziranih kemoterapijom i G-CSF-om prinos CD34+ stanica se tijekom LVV se ne mijenja, osim na samom početku leukaferenze kada je manji prinos CD34+ stanica, što potvrđuju rezultati našeg istraživanja i izvješća iz literature.<sup>61, 120</sup> Tijekom LVV dolazi do promjene prinosa leukocita, mononuklearnih stanica i CD34+ stanica u produktu leukaferenze sakupljenom u 6 vrećica. Prinos stanica je značajno manji samo u prvoj vrećici u koju su sakupljene stanice tijekom obrade prvog volumena krvi, dok nema razlike u prinosu stanica između sljedećih vrećica. Valja osobito naglasiti ovu stabilnost prinosa CD34+ stanica tijekom cijele leukaferenze, unatoč smanjenju broja CD34+ stanica u perifernoj krvi.

Manji prinos stanica na početku LVV tijekom obrade prvog volumena krvi smatra se posljedicom razrjeđenja produkta fiziološkom otopinom (*engl. dilution effect*). U prvoj vrećici se za razliku od ostalih vrećica nalazi desetak mililitara

fiziološke otopine kojom je prije početka postupka bio ispunjen set za aferezu. S obzirom da prosječan volumen produkta leukaferoze u pojedinačnoj vrećici iznosi  $48,59 \pm 5,07$  mL, desetak mililitara fiziološke otopine može značajno razrijediti sakupljene stanice. Valja istaknuti da se ovo razrijeđenje ne može izbjeći budući da je punjenje cijevi fiziološkom otopinom dio obaveznog automatskog postupka separatora.

Na prinos CD34+ stanica utječe učinkovitost sakupljanja staničnog separatora. Ukupna učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica postupkom LVV iznosila je  $70,9 \pm 33,21\%$  što odgovara rezultatima drugih istraživanja u kojima je korištena ista vrsta staničnog separatora.<sup>129</sup> Tijekom postupka LVV učinkovitost sakupljanja mononuklearnih i CD34+ stanica bila je jednaka, izuzev manje učinkovitosti na početku leukaferoze. Drugi autori su također izvjestili o smanjenoj učinkovitosti sakupljanja na početku leukaferoze.<sup>90, 120, 126</sup>

Na početku leukaferoze potrebno je određeno vrijeme za uspostavljanje stabilnog razgraničenja između plazme i staničnog sloja (*engl. interface*) u separacijskoj komorici i cijevi za sakupljanje što je uvjet za sakupljanje željenog sloja mononuklearnih stanica. Zato se tijekom obrade prvog volumena krvi obično ne sakupljaju samo mononuklearne stanice, već i druge stanice kao što su granulociti ili trombociti, a to smanjuje učinkovitost sakupljanja. Manja učinkovitost sakupljanja vjerojatno pridonosi manjem prinosu CD34+ stanica koji je opažen na početku leukaferoze.

U našem je istraživanju, kao i u istraživanju Cassens i sur. udio mononuklearnih stanica bio konstantan tijekom LVV.<sup>99</sup> S obzirom na to može se zaključiti da povećanje volumena obrađene krvi ne utječe na kvalitetu produkta tijekom LVV jer ne dolazi do veće kontaminacije produkta s granulocitima tijekom završnih faza afereze.

Iako je prinos CD34+ stanica očekivano veći u skupini dobrih mobilizatora, dinamika sakupljanja CD34+ stanica je ista kod svih ispitanika, a to je manji prinos i učinkovitost tijekom obrade prvog volumena krvi, a stabilan prinos i



učinkovitost u daljnjem tijeku LVV. Stoga ima smisla primjeniti LVV u svih bolesnika bez obzira na stupanj mobilizacije CD34+ stanica u krv.

### **5.5. Subpopulacije CD34+ stanica sakupljenih tijekom leukaferoze velikog volumena**

Postupak LVV povećava prinos CD34+ stanica, ali još nije poznato utječe li povećanje protoka krvi, primjena dodatnog antikoagulansa heparina ili pak produženo izlaganje krvi stranim površinama na subpopulacije sakupljenih CD34+ stanica. Biljeg CD34 je specifičan i identificira krvotvorne stanice koje se nalaze u raznim stadijima diferencijacije i to od matičnih stanica koje su sposobne dugotrajno obnoviti sve funkcije koštane srži pa sve do prastanica usmjerenih u mijeloidnu, eritroidnu, megakariocitnu i limfoidnu lozu. Određivanjem drugih biljega koji se nalaze uz biljeg CD34+ može se identificirati subpopulacija usmjerenih prastanica (CD38, HLA-DR), prastanica specifičnih za pojedine loze (CD33, CD41, CD117), kao i nezrelih ili multipotentnih prastanica (CD133 i CD90). Napredak u razumijevanju mehanizama mobilizacije i udomljavanja KMS usmjerava pozornost na adhezijsku molekulu VLA-4 koja se nalazi na površini KMS te stupa u interakciju s VCAM-1 (CD106) i fibronektinom.<sup>130</sup> Biljezi CD49d ( $\alpha 4$ -lanac) i CD29 ( $\beta 1$ -lanac) su sastavni dijelovi integrina VLA-4. Smatra se da se međusobno adhezivno djelovanje VLA-4/VCAM-1 prekida djelovanjem proteaza koje otpuštaju neutrofili nakupljeni u ekstravaskularnom odjeljku koštane srži nakon primjene citokina, što pak dovodi do mobilizacije KMS i porasta topljivog oblika VCAM-1 u serumu bolesnika.<sup>17</sup>

O razlikama između subpopulacija CD34+ stanica u koštanoj srži ili u produktu leukaferoze sakupljenom nakon mobilizacije izvješteno je u malom broju istraživanja.<sup>131, 132</sup> Analiza udjela subpopulacija CD34+ stanica u koštanoj srži prije i nakon mobilizacije te u produktu leukaferoze sakupljenom u istih bolesnika pokazala je da stanice sakupljene aferezom i stanice koštane srži nakon mobilizacije u odnosu na stanice ne-mobilizirane koštane srži sadrže značajno veći udio mijeloidnih prastanica koje uz biljeg CD34 izražavaju i biljeg CD33. Nije nađena razlika s obzirom na koekspresiju biljega CD38 i HLA-DR

između tri promatrana odjeljka.<sup>133</sup> Podaci koji uspoređuju subpopulacije CD34+ stanica u uzorku koštane srži i KMS sakupljenim leukaferozom u različitim bolesnika potvrđuju veći udio CD34+ stanica s koekspresijom CD33 u produktu leukaferoze, dok se značajno veći udio CD34+CD38- ili CD34+HLA-DR- stanica nalazi u nemobiliziranoj koštanoj srži u odnosu na mobilizirane KMS.<sup>134</sup> U koštanoj srži nađen je veći udio CD34+ stanica usmjerenih u B lozu (CD19+) u odnosu na mobiliziranu perifernu krv.

Iako neki autori izvještavaju da određivanje subpopulacija CD34+ stanica može pomoći pri procjeni kvalitete transplantata KMS, ipak njihova uloga u prognozi hematološkog oporavka nije u cijelosti razjašnjena.<sup>135</sup> Od posebnog interesa je populacija CD34+CD38- stanica koja čini 1% stanica koštane srži, a koja sadrži primitivne KMS s velikom sposobnošću replikacije i koje su odgovorne za dugotrajnu repopulaciju koštane srži nakon transplantacije.<sup>136</sup> Henon i sur. su ispitali je li premali broj CD34+CD38- stanica mogući razlog odgođenog hematološkog oporavka unatoč transplantacije dovoljnog broja CD34+ stanica.<sup>135</sup> Naime oni drže da broj CD34+CD38- stanica, kao manje zrelih prastanica odgovornih za prihvaćanje transplantata, točnije predviđa oporavak leukocita i trombocita te čak predlažu broj od  $5 \times 10^4/\text{kg}$  TT CD34+CD38- stanica kao minimalan kriterij za uspješan hematološki oporavak. Stewart i sur. su, naprotiv, pokazali da je za predviđanje brzine hematološkog oporavka važniji broj transplantiranih CD34+ stanica od broja CD34+CD38- i CD34+CD33- stanica.<sup>137</sup> Rezultati istraživanja Bojka i sur. također pokazuju da hematološki oporavak u prvom redu ovisi o broju transplantiranih CD34+ stanica/kg TT.<sup>101</sup> U njihovih bolesnika oko 25% CD34+ stanica dodatno je izražavalo biljeg CD49d, međutim broj CD34+CD49d+ stanica nije korelirao niti s oporavkom leukocita niti trombocita.<sup>101</sup> Različiti rezultati ispitivanja uloge pojedinih subpopulacija CD34+ stanica u hematološkom oporavku vjerojatno su posljedica heterogenih skupina ispitivanih bolesnika, različitih mobilizacijskih protokola ili pak razlika pri određivanju imunofenotipa ovih stanica protočnom citometrijom. Preporuke za brojanje CD34+ stanica su jasno definirane, dok takve preporuke ne postoje za

određivanje subpopulacija CD34+ stanica pa i to može biti uzrokom razlika između rezultata različitih istraživanja.<sup>138</sup>

Nerazjašnjeno je pitanje dolazi li tijekom LVV do promjene u subpopulacijama sakupljenih CD34+ stanica i jesu li određene subpopulacije sklonije novačenju od drugih. Hillyer i sur.<sup>97</sup> su prvi analizirali subpopulaciju CD34+HLA-DR+ u grupi od 9 zdravih dobrovoljaca. Ovo je jedino istraživanje koje je izvjestilo o udvostručenju broja CD34+HLA-DR+ stanica sakupljenih tijekom druge polovice 4-satne LVV u odnosu na broj stanica sakupljenih tijekom prva 2 sata LVV.

Za razliku od njih, Murea i sur. nisu u produktu leukaferenze sakupljenom tijekom obrade prvih 10 L krvi zamjetili razliku u subpopulacijama stanica koje su uz biljeg CD34+ izražavale jedan od biljega CD38, Thy-1, c-kit, CD33, CD45RA u odnosu na obradu drugih 10 L krvi bolesnika.<sup>89</sup> Niti Smolowicz i sur.<sup>104</sup> nisu našli razliku u sadržaju CD34+CD33+ i CD34+HLA-DR+ stanica u produktu sakupljenom tijekom obrade manje od 16 L krvi u odnosu na produkt tijekom obrade više od 16 L krvi. Njihovi rezultati se vjerojatno razlikuju od rezultata Hillyerovog istraživanja<sup>97</sup> jer je ono provedeno na zdravim dobrovoljcima u kojih nisu primjenjeni nikakvi agensi za mobilizaciju, za razliku od ostalih istraživanja u kojima su sudjelovali bolesnici nakon mobilizacije kemoterapijom i G-CSF-om .

Humpe i sur. su u 23 bolesnika liječenih zbog ne-Hodgkinova limfoma i karcinoma dojke proveli prospektivno randomizirano istraživanje u kome je bolesnicima jedan dan tijekom leukaferenze ukupan volumen krvi obrađen dva puta, a slijedeći dan četiri puta.<sup>139</sup> Analizirali su razlikuju li se u produktu leukaferenze subpopulacije CD34+ stanica koje dodatno izražavaju jedan od biljega CD117, CD38, CD90, HLA-DR, CD19, CD7, CD33 ili CD41 s obzirom na volumen obrađene krvi. Pokazalo se da obrada 4 ukupna volumena krvi bolesnika u odnosu na obradu 2 volumena krvi dovodi do značajnog porasta prinosa CD34+ stanica, ali ne i do promjene udjela supopulacija CD34+ stanica u produktu leukaferenze. Iako je relativni udio subpopulacija u produktu leukaferenze jednak bez obzira na obrađen volumen krvi, budući da je prinos CD34+ stanica

bio značajno veći u produktu LVV on je sadržavao i veći apsolutni broj nezrelih CD34+CD38-, CD34+HLA-DR- i CD34+CD33- stanica. Njihovi rezultati pokazuju da se postupkom LVV sakuplja veći broj KMS i nezrelih prastanica odgovornih za dugotrajnu repopulacijsku sposobnost transplantata.

U ovom istraživanju produžili smo leukaferazu na obradu još dva dodatna volumena krvi pa je analizirano dolazi li tijekom ove dodatne obrade do promjene u subpopulacijama CD34+ stanica u odnosu na obradu prva 4 volumena krvi. Diferencijacijski status KMS i prastanica određen je analizom istodobnog izražavanja biljega CD38, CD90 ili HLA-DR, usmjerenje u mijeloidnu lozu biljekom CD33 i CD117/c-kit, a u megakariocitnu lozu biljekom CD41. Do sada u literaturi nije objavljena analiza supopulacija u produktu leukaferaze sakupljenom obradom tako velikog volumena krvi bolesnika (ukupnog volumena čak 6 puta).

Kao i u drugim istraživanjima, tako je i u ovom većina CD34+ stanica iz produkta leukaferaze istodobno izražavala biljege CD38, HLA-DR ili CD33 koji su znak usmjerenosti matične stanice u pojedine krvne loze.<sup>140</sup> Tek je manji udio CD34+ stanica (21%) izražavalo biljeg CD41 koji je znak usmjerenosti u megakariocitnu lozu. Udio primitivnije subpopulacije CD34+ stanica koje istodobno izražavaju biljeg CD90/Thy-1 u ovom istraživanju, kao i kod Stewarta i sur., bio je u velikom rasponu od 10 do 73%, uz srednju vrijednost od 47%.<sup>141</sup> Usporedba kvalitete produkta leukaferaze sakupljenog tijekom obrade ukupno 4 volumena krvi s produktom sakupljenim tijekom produžene obrade još dva dodatna volumena krvi nije pokazala razliku niti u jednoj od promatranih subpopulacija CD34+ stanica. Udio stanica koje uz CD34 istodobno izražavaju još jedan od biljega koji pokazuju stupanj njihove zrelosti kao što su CD38, HLA-DR ili CD90/Thy-1, odnosno usmjerenosti u pojedine krvne loze CD41+, CD117+/c-kit ili CD33+, bio je jednak tijekom cijelog postupka obrade velikog volumena krvi, što upućuje da je kvaliteta produkta ista tijekom cijelog postupka. Iz toga se može zaključiti da ima smisla obraditi i ovako veliki volumen krvi jer se stanice važne za dugotrajnu repopulaciju koštane srži kao i za brzi hematološki oporavak neće iscrpiti iz krvi tijekom postupka LVV.

Kratkotrajnim uzgojem stanica koštane srži procjenjuje se klonogena sposobnost usmjerenih krvotvornih prastanica koje stvaraju CFU-GM, BFU-E i CFU-MIX kolonije. Usporedba kvalitete produkta leukaferenze sakupljenog tijekom obrade ukupno 4 volumena krvi s produktom sakupljenim tijekom produljene obrade još dva dodatna volumena krvi nije pokazala razliku u brojnosti CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija nakon kratkotrajnog uzgoja stanica. Ti rezultati također upućuju da je kvaliteta produkta leukaferenze s obzirom na klonogenu sposobnost sakupljenih usmjerenih krvotvornih stanica ista tijekom cijelog postupka obrade velikog volumena.

Završna potvrda kvalitete KMS sakupljenih iz krvi postupkom LVV je potvrda njihove sposobnosti da *in vivo* nakon transplantacije u primatelja obnove sve funkcije krvotvornog sustava. Postupkom LVV može se učinkovito sakupiti dovoljan broj stanica za uspješnu transplantaciju što potvrđuje pravovremeni oporavak funkcije krvotvornog sustava u svih naših bolesnika transplantiranih s KMS sakupljenim obradom velikog volumena krvi.

## **5.6. Novačenje CD34+ stanica tijekom leukaferenze velikog volumena**

Budući da većina istraživanja pokazuje stalan prinos CD34+ stanica tijekom LVV, smatra se da tijekom postupka dolazi do dodatnog otpuštanja CD34+ stanica u perifernu krv. Pojava dodatnog otpuštanja CD34+ stanica u perifernu krv do koje dolazi tijekom leukaferenze naziva se novačenje (*engl. recruitment*).<sup>120</sup> Ako tijekom leukaferenze ne bi došlo do novačenja, broj CD34+ stanica bi se tijekom vremena smanjio kako u produktu leukaferenze tako i u krvi. Za utvrđivanje dolazi li tijekom leukaferenze do novačenja stanica u perifernu krv koristi se formula koju su opisali Cull i sur., a koja uspoređuje zbroj ukupnog broja sakupljenih stanica u produktu leukaferenze i stanica dostupnih u krvi nakon leukaferenze s brojem stanica koje su bile na raspolaganju u krvi prije početka leukaferenze i izražava se faktorom novačenja.<sup>120</sup>

Već su Hillyer i sur. 1991. godine pretpostavili da sam postupak leukaferenze potiče otpušanje KMS u perifernu krv. U svom istraživanju su

zamjetili dvostruki porast CFU-GM u zdravih dobrovoljaca tijekom LVV u kojoj je obrađeno 18,5 L krvi.<sup>92</sup> Hipoteza novačenja tijekom LVV je podržana u sljedećim istraživanjima iste grupe autora sa sličnim rezultatima.<sup>97, 142</sup> Passos-Coelho i sur. su došli do istog zaključka kada su usporedili ukupan prinos KMS u produktu LVV u bolesnika mobiliziranih kemoterapijom i G-CSF-om.<sup>98</sup> Iako brojni autori spominju da se obradom većeg volumena krvi sakuplja i veći broj stanica od očekivanog, tek je u malom broju istraživanja to i točno izračunato. U većini je istraživanja poznat samo broj CD34+ stanica prije leukaferoze i broj sakupljenih CD34+ stanica, a izostavljen je broj CD34+ stanica u krvi nakon leukaferoze pa se cjelovita analiza novačenja niti ne može učiniti.

Knudsen i sur.<sup>113</sup> su na velikoj skupini od 205 bolesnika pokazali da tijekom obrade dva ukupna volumena bolesnikove krvi dolazi do novačenja CD34+ stanica. Iako se broj CD34+ stanica u perifernoj krvi smanjio na početku leukaferoze, ipak je sakupljeno 1,5 puta više CD34+ stanica od broja koji je bio dostupan na početku, a da pri tom nije nađeno povećano otpuštanje ni trombocita niti granulocita. Njihovi rezultati potvrđuju da tijekom standardne leukaferoze dolazi do povećanog otpuštanja CD34+ stanica u perifernu krv što odgovara objavljenim rezultatima drugih istraživanja.<sup>105, 120, 126</sup> Istraživanja Smolowica i sur., kao i Benjamina i sur. također su pokazala da i u standardnoj leukaferozu u manjoj mjeri nego u LVV dolazi do novačenja KMS.<sup>105, 143</sup>

Istraživanje Bolana i sur. provedeno kod zdravih davatelja alogenih KMS pokazalo je da se tijekom obrade 5 volumena krvi sakupi približno 2 puta više CD34+ stanica nego što ih je bilo dostupno na početku leukaferoze.<sup>144</sup> U njihovih davatelja jedan sat nakon leukaferoze dolazi do porasta broja limfocita i CD34+ stanica u krvi, a taj je porast prosječno pet puta veći od istodobnog porasta broja trombocita što ukazuje na značajniji pomak CD34+ stanica i limfocita u intravaskularni prostor u razdoblju neposredno nakon afereze.

Iako su istraživanja LVV heterogena i provedena na malom broju bolesnika, neupitno je da u odraslih bolesnika bez obzira na primjenjenu vrstu mobilizacije dolazi do novačenja CD34+ stanica.<sup>98, 105, 120, 126</sup> Razlike u intenzitetu

novačenja CD34+ stanica koji se opažaju u objavljenim istraživanjima vjerojatno su posljedica primjene različitih mobilizacijskih protokola, obilježja postupka leukaferoze te volumena obrađene krvi. Cull i sur. su tijekom obrade 21 L krvi sakupili 1,4 puta više stanica nego je bilo dostupno prije leukaferoze.<sup>120</sup> Rowley i sur. su, kao i ovo istraživanje pokazali, da se tijekom obrade 6 volumena krvi unatoč smanjenju broja CD34+ stanica u perifernoj krvi uz konstantan prinos CD34+ stanica sakupi trostruko više stanica nego je bilo dostupno na početku leukaferoze.<sup>79</sup>

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da tijekom leukaferoze dolazi do dodatnog novačenja CD34+ stanica iz koštane srži u perifernu krv budući da je postupkom LVV sakupljeno  $3,23 \pm 1,61$  puta više CD34+ stanica od ukupnog broja stanica koje su bile dostupne u perifernoj krvi prije početka sakupljanja. Mononuklearnih stanica je sakupljeno također više ( $2,72 \pm 0,69$  puta) od ukupnog broja dostupnog u perifernoj krvi prije početka leukaferoze. Faktor novačenja za leukocite je iznosio  $1,64 \pm 0,54$ , granulocite  $1,42 \pm 0,51$  i trombocite  $1,17 \pm 0,20$  što pak ukazuje da tijekom leukaferoze ne dolazi dodatnog novačenja ovih stanica. Različiti faktor novačenja CD34+, mononuklearnih stanica, granulocita i trombocita je rezultat manje učinkovitosti sakupljanja granulocita i trombocita u odnosu na željene mononuklearne i CD34+ stanice budući da u krvi tijekom LVV dolazi do podjednakog smanjenja svih promatranih stanica. Budući da u krvi ne dolazi do većeg smanjenja broja CD34+ i mononuklearnih stanica u odnosu na druge krvne stanice, očito je da tijekom LVV dolazi do većeg otpuštanja ovih stanica iz drugih ekstravaskularnih rezervoara. Sakupljanje trostruko većeg broja CD34+ stanica nego što ih je bilo u krvi na početku ukazuje da se one tijekom LVV otpuštaju iz drugih ekstravaskularnih rezervoara, iako postupno smanjenje njihovog broja u krvi upućuje da se otpuštaju sporijom brzinom nego ih uklanja stanični separator.

Zanimljivo je da je u našem istraživanju u bolesnika koji su lošije mobilizirali CD34+ stanice faktor novačenja bio značajno veći ( $4,14 \pm 0,49$ ) nego u dobrih mobilizatora ( $2,84 \pm 0,37$ ), bez obzira na njihovu dijagnozu. Kod lošijih

mobilizatora je u perifernoj krvi nakon leukaferenze smanjenje broja CD34+ stanica bilo značajno manje izraženo nego kod dobrih mobilizatora što je vjerojatno posljedica većeg novačenja CD34+ stanica u ovih bolesnika koje nadoknađuje stanice sakupljene leukaferenzom. Torrabadella i sur. su također pokazali da tijekom postupka LVV dolazi do većeg novačenja CD34+ stanica u bolesnika koji su imali manji broj CD34+ stanica u perifernoj krvi.<sup>145</sup> Ovi rezultati upućuju da je novačenje KMS, koje je opaženo u svih bolesnika, jače izraženo u loših mobilizatora što potvrđuje važnost primjene LVV u ovoj skupini bolesnika jer može smanjiti broj potrebnih postupaka za sakupljanje transplantata.

Glavni izvor CD34+ stanica je odjeljak koštane srži te se smatra da se CD34+ stanice i novače iz ovog odjeljka. Međutim, moguće je da se stanice novače i iz drugih ekstravaskularnih rezervoara CD34+ stanica izvan koštane srži. Budući da tijekom LVV ne dolazi do promjene subpopulacija sakupljenih CD34+ stanica, što pokazuju rezultati ovog kao i drugih istraživanja, CD34+ stanice se vjerojatno dodatno otpuštaju iz istih izvora.<sup>113</sup>

Rezultati provedenih istraživanja potvrđuju postojanje fenomena novačenja tijekom LVV, ali se još uvijek nedovoljno zna o mehanizmima koji uzrokuju dodatno otpušanje CD34+ stanica u krv tijekom leukaferenze. Moguće je da sam postupak leukaferenze ima direktan stimulacijski učinak na otpušanje CD34+ i to bilo jednostavnim mehanizmom povratne sprege putem kojeg koštana srž pokušava nadoknaditi stanice koje je separator izdvojio iz krvi, bilo interakcijom heparina s molekula koje sudjeluju u udomljavanju stanica u koštanoj srži ili pak promjenom uvjeta u koštanoj srži uzrokovanih hipokalcemijom zbog primjene citrata. Međutim isto tako je moguće da je fenomen novačenja samo posljedica primjene citokina G-CSF koji se koristi u mobilizaciji KMS.

Cassens i sur. smatraju da opaženo novačenje CD34+ stanica nije izazvano samim postupkom leukaferenze, već da je posljedica primjene G-CSF.<sup>129</sup> Poznato je da primjena citokina G-CSF izaziva kontinuirano otpušanje KMS u perifernu krv, dok se istodobno dio ovih stanica vraća u koštanu srž i to bez



obzira uklanjaju li se ove stanice leukaferozom. Stoga je moguće da leukaferoza nema nikakav učinak na ovo dodatno otpuštanje te da su za sakupljanje većeg broja CD34+ stanica od dostupnog na početku postupka odgovorne samo farmakodinamičke promjene CD34+ stanica u krvi uzrokovane primjenom G-CSF.<sup>146</sup>

Novačenje KMS u krv može biti posljedica i direktnog djelovanja LVV putem mehanizma povratne sprege koji sam ili u suradnji s drugim faktorima regulira broj CD34+ stanica u krvi. Naime, smanjenje broja CD34+ stanica do kojeg dolazi u krvi na početku leukaferoze može biti poticaj za novačenje ovih stanica u krv tijekom postupka afereze. Humpe i sur. su novačenje KMS tijekom LVV pokušali objasniti modelom dinamičke ravnoteže koja se uspostavlja između 3 zasebna odjeljka: koštane srži, periferne krvi i izvantjelesnog volumena staničnog separatora.<sup>90</sup> Budući da stanični separator izdvaja CD34+ stanice u vrećicu s produktom, njihov broj u krvi se smanjuje. Smanjenje broja CD34+ stanica se nadoknađuje dodatnim otpušanjem stanica iz koštane srži ili iz drugih ekstravaskularnih rezervoara. Moller i sur. su izvijestili o novačenju CD34+ stanica tijekom obrade 4 volumena krvi i smatraju da novačenje ovih stanica iz koštane srži u perifernu krv započinje već 30 do 60 min nakon početka leukaferoze.<sup>102</sup> Do novačenja CD34+ stanica vjerojatno dolazi nedugo nakon početka leukaferoze jer nakon što se njihov broj u krvi značajno smanji odmah na početku leukaferoze, u daljnjem tijeku leukaferoze više ne dolazi do značajnog smanjenja. Ova opažanja upućuju da broj KMS u perifernoj krvi kontroliraju homeostatski mehanizam ili mehanizam povratne sprege. Nakon što stanični separator ukloni CD34+ stanice iz krvi, vjerojatno se aktivira mehanizam povratne sprege koji pokušava nadoknaditi i održati konstantnim broj KMS u krvi. Kao rezultat toga, u daljnjem tijeku leukaferoze KMS se novače iz koštane srži u odjeljak periferne krvi.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je tijekom leukaferoze novačenje ograničeno na frakciju stanica koja se dominantno izdvaja iz krvi tijekom postupka. Ne dolazi do novačenja granulocita i trombocita, dok je faktor

novačenja mononuklearnih i CD34+ stanica jednak. Budući da se većina granulocita i trombocita tijekom leukaferoze vraća u cirkulaciju bolesnika, smanjenje broja ovih stanica vrlo vjerojatno nikada ne dosegne kritičnu točku kod koje se aktivira mehanizam dodatnog otpuštanja i ovih stanica u krv, a upitno je i postoji li dodatna rezerva ovih stanica kao što postoji za KMS u koštanoj srži. Istraživanja Heynsa i sur., kao i Lee i Schiffera, koja su tijekom trombocitaferoze pratila kinetiku i mobilizaciju trombocita obilježenih indijem 111 iz slezene dokazala su postojanje rezervoara trombocita dostupnog aferezom koji je približno 1,4 puta veći od sadržaja trombocita u jednom volumenu krvi bolesnika.<sup>147, 148</sup>

Uz to, stres izazvan samim postupkom leukaferoze, hipotenzijom ili pomakom krvi u ekstrakorporalnu cirkulaciju može povećati razinu adrenokortikotropnog hormona za kojega je poznato da dovodi do brzog i kratkotrajnog porasta broja KMS u krvi.<sup>49, 149</sup>

Hipokalcemija uzrokovana primjenom citrata koji se koristi tijekom LVV za sprječavanje zgrušavanja može doprinjeti novačenju KMS. U mobilizaciji KMS važnu ulogu imaju adhezijske molekule iz obitelji selektina kao što su L-selektin koji se nalazi na CD34+ stanicama i P-selektin koji se nalazi na endotelnim stanicama.<sup>150</sup> Selektine ubrajamo u skupinu adhezijskih proteina koji su zavisni o ionima kalcija ( $Ca^{2+}$ ).<sup>151</sup> Na dugačkom ekstracelularnom dijelu selektina nalaze se mjesta na koja se veže  $Ca^{2+}$  koji je neophodan za stvaranje labave adhezije matičnih stanica za površinu endotelnih stanica. Infuzija antikoagulantne otopine citrata smanjuje razinu ioniziranog kalcija što može smanjiti i adheziju CD34+ stanica posredovanu selektinima i olakšati njihovo otpušanje iz koštane srži u krv. Važnost selektina u otpuštanju KMS potvrđuje istraživanje provedeno u pasa koje je pokazalo da je sintetički polianion dekstran sulfat, koji kompetitivno blokira L-selektin, snažan mobilizacijski agens za limfocite.<sup>40</sup>

Heparin koji se primjenjuje u LVV kao dodatni antikoagulans razmatra se kao jedan od mogućih faktora koji utječu na novačenje KMS u krv.<sup>152</sup> Uloga heparina i njegovih kataboličkih fragmenata na novačenje KMS tijekom LVV

treba se tek razjasniti jer rezultati laboratorijskih istraživanja pokazuju da heparin ili neki od njegovih fragmenta mogu modificirati kretanje (*engl. trafficking*) matičnih stanica i prastanica što bi moglo utjecati na povećanje broja ovih stanica u krvi tijekom leukaferoze. Dobro je poznato svojstvo vezanja heparina i drugih glikozaminoglikana za SDF-1 $\alpha$  (*engl. stromal-cell derived factor*). SDF-1 je kemokin koji se veže za CXCR-4 kemokinski receptor koji se nalazi na KMS i prastanicama, a migracija posredovana SDF-1/CXCR-4 važna je za mobilizaciju i udomljavanje KMS. Istraživanja su pokazala da se SDF-1 veže za heparin i heparan sulfat putem regije koja specifično prepoznaje heparin.<sup>153</sup> Vezanje glikozaminoglikana na kemokine utječe na njihovu funkciju. Sbaa-Ketata i sur. su istraživali kako primjena različitih fragmenata glikozaminoglikana hijaluronske kiseline utječe na kemotaktični učinak ovisan o SDF-1 $\alpha$  na CD34+ stanice iz periferne krvi.<sup>154</sup> Oni su opisali kako se *in vitro* dodavanjem različitih oligosaharida koji su derivati glikozaminoglikana pojačava kemotaktični učinak SDF-1 $\alpha$  na migraciju CD34+ stanice.

Još jedan od mogućih načina interakcije heparina s mikrookolišem KMS je putem adhezijskih molekula. PECAM-1 (*engl. platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) (CD31) je jedna od brojnih adhezijskih molekula koje izražava KMS, a nalazi se na mijeloidnim i limfoidnim prastanicama, stromalnim i endotelnim stanicama i smatra se da ima središnju ulogu u regulaciji hematopoeze.<sup>155</sup> Laboratorijska istraživanja su pokazala da udomljavanje i transendotelna migracija KMS ovise upravo o adhezijskoj molekuli PECAM-1 koja veže heparin.<sup>156</sup> Stoga primjena heparina tijekom LVV može utjecati na interakciju PECAM-1-a s glikozaminoglikanima, a to može povećati broj KMS u perifernoj krvi.

### **5.7. Važnost leukaferoze velikog volumena u bolesnika s multiplim mijelomom**

Dosadašnja klinička istraživanja su pokazala da visoke doze kemoterapije i transplantacija autolognih KMS poboljšavaju preživljenje bez znakova bolesti i ukupno preživljenje bolesnika s multiplim mijelomom mlađih od 65 godina.<sup>157</sup>

Nedavna nerandomizirana i randomizirana istraživanja su pokazala bolje preživljenje bolesnika s multiplim mijelomom koji su liječeni s dvije transplantacije od onih koji su liječeni samo s jednom transplantacijom.<sup>158</sup> Nemet i sur.<sup>159</sup> su evaluirali provedivost, učinkovitost i toksičnost ovog terapijskog pristupa. Rezultati tog istraživanja ukazuju da je dvostruka transplantacija izvediva u većine bolesnika te da poboljšava preživljenje bez znakova bolesti i ukupno preživljenje uz nisku smrtnost zbog postupka transplantacije čak i u starijih bolesnika. Upravo su ti rezultati razlog što je dvostruka transplantacija standardni postupak u našoj ustanovi pa je za sve bolesnike s multiplim mijelomom potrebno sakupiti dovoljan broj KMS iz krvi za dvije transplantacije.

Gazitt i sur. su u svim produktima leukaferenze prikupljenim nakon mobilizacije ciklofosamidom i G-CSF-om dokazali metodom PCR-a hipervarijabilnu regiju imunoglobulina CDRIII plazma stanica.<sup>160</sup> Osim toga, oni su u bolesnika mobiliziranih s ciklofosamidom i GM-CSF određivali brojnost plazma-stanica u perifernoj krvi određivanjem lakog lanca Ig protočnom citometrijom i kvantitativnim PCR za hipervarijabilnu regiju imunoglobulina CDRIII plazma stanica.<sup>160</sup> Rezultati tog istraživanja pokazali su da se plazma stanice mobiliziraju u perifernu krv s nekoliko dana zakašnjenja u odnosu na KMS, to jest najveći broj KMS nađen je u krvi tijekom prva dva dana leukaferenze, dok je najveći broj plazma-stanica u krvi nađen tek peti i šesti dan od početka leukaferenze. Ova spoznaja o različitom vremenu mobilizacije važna je za planiranje sakupljanja i može se iskoristiti za smanjenje kontaminacije produkta leukaferenze tumorskim stanicama. Desikan i sur. su potvrdili da se tumorske stanice u krvi bolesnika s multiplim mijelomom pojavljuju sa zakašnjenjem od nekoliko dana u odnosu na KMS, pa su analizirali može li se s LVV sakupiti veći broj KMS u bolesnika s multiplim mijelomom te ima li to utjecaja na količinu stanica sakupljenih sljedeći dan.<sup>161</sup> Oni su analizirali leukaferenze koje su trajale 4 sata i tijekom kojih je obrađeno oko 15 litara krvi.<sup>161</sup> Rezultati tog istraživanja pokazuju da se tijekom druge polovine postupka ne smanjuje broj sakupljenih stanica te da LVV ne ugrožava broj stanica sakupljenih sljedeći dan. Ti podaci

odgovaraju rezultatima ovog istraživanja u kojem se broj sakupljenih CD34+ stanica održava bez promjene tijekom cijelog postupka. Budući da se tijekom LVV sakupi više stanica, a može se smanjiti i stupanj kontaminacije pripravka tumorskim stanicama, ovaj postupak bi trebao postati standardni u bolesnika s multiplim mijelomom u kojih se planira dvostruka transplantacija. Osim toga, LVV treba također razmotriti za bolesnike u kojih se planira *ex-vivo* obrada sakupljenih stanica jer tada treba sakupiti dvostruko veći broj CD34+ stanica zbog mogućnosti njihovog gubitka tijekom obrade.<sup>89</sup>

#### **5.8. Usporedba uspješnosti sakupljanja krvotvornih matičnih stanica obradom 4 naspram 6 volumena krvi bolesnika**

Obradom velikog volumena krvi značajno se smanjio broj leukaferaza potrebnih za sakupljanje dovoljnog broja stanica za transplantaciju, što su i drugi autori istaknuli kao značajnu prednost LVV.<sup>128</sup> Tako su primjerice Humpe i sur. su kao i Abrahamsen i sur. izvjestili o većem prinosu CD34+ stanica kada je volumen obrađen 4 puta u odnosu na samo 2 puta kako kod dobrih tako i kod loših mobilizatora.<sup>90, 162</sup> U ovom je istraživanju ispitana uspješnost sakupljanja nakon obrade 6 volumena bolesnikove krvi. Usporedba prinosa CD34+ stanica tijekom obrade ukupno 4 volumena krvi u odnosu na obradu ukupno 6 volumena krvi pokazala je da je prinos leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica statistički značajno veći kod postupka LVV. Sakupljanje KMS ocjenjeno je kao uspješno ako je ukupan prinos CD34+ stanica bio  $\geq 3,5 \times 10^6/\text{kgTT}$ . Tijekom obrade 4 ukupna volumena krvi transplantat tj. više od  $3,5 \times 10^6/\text{kgTT}$  CD34+ stanica, je sakupljen u 30,0 % bolesnika, dok je tijekom obrade 6 ukupnih volumena krvi u istih bolesnika transplantat sakupljen u 63,7% slučajeva.

Budući da je u bolesnika s multiplim mijelomom planirano liječenje dvostrukom transplantacijom, dodatno je analizirano u koliko njih je postupkom LVV sakupljeno  $\geq 7 \times 10^6/\text{kgTT}$  CD34+ stanica što je dostatno za dvostruku transplantaciju. Obradom 4 volumena krvi bi kod 30% bolesnika s multiplim mijelomom bio sakupljen jedan transplantat, a samo bi kod jednog (5%)

bolesnika bila sakupljena dva transplantata. Produživanjem leukaferoze i obradom ukupno 6 volumena krvi kod tih istih bolesnika je u 45% bolesnika sakupljen jedan transplantat, a čak kod 30% bolesnika dva transplantata. Prema tome obrada šest volumena krvi omogućuje sakupljanje transplantata i u bolesnika čiji je inicijalni broj CD34+ stanica nedostatan za sakupljanje standardnom leukaferozom. Za većinu bolesnika, čak i za loše mobilizatore, mogućnost sakupljanja dovoljnog broja CD34+ stanica nakon mobilizacije je veća kad se KMS sakupljaju postupkom LVV.

Na ovom mjestu valja istaknuti da je smanjenje troškova još jedna značajna prednost primjene LVV. Potreba za dodatnom leukaferozom znači dodatne troškove zbog još jednog dana boravka u bolnici, citokina za mobilizaciju, seta za sakupljanje, antikoagulantne otopine, kao i troškova za krioprezervaciju dodatne vrećice transplantata. Primjenom LVV i prikupljanjem većeg broja stanica s manjim brojem postupaka smanjuju se troškovi sakupljanja KMS, kao i poslijetransplantacijske skrbi jer transplantacija većeg broja CD34+ stanica znači i brži hematološki oporavak.

Uz to što primjena LVV može smanjiti ekonomske troškove i doprinjeti udobnosti bolesnika, sakupljanje dovoljnog broja stanica sa što je moguće manjim brojem leukaferoza vjerojatno može utjecati i na kvalitetu prikupljenog transplantata. Watts i sur. smatraju da je broj CD34+ stanica koje je potrebno sakupiti za uspješnu transplantaciju viši u slučaju kad je za prikupljanje transplantata potrebno više leukaferoza budući da se s vremenom udio nezrelih KMS mobiliziranih u krvi smanjuje.<sup>163</sup> Haas i sur. su opazili da se u produktima leukaferoze sakupljenim tijekom nekoliko dana postupno u svakoj slijedećoj leukaferozu smanjuje udio CD34+Thy-1+ stanica koje predstavljaju nezrele oblike u populaciji CD34+ stanica.<sup>164</sup> Ovo opažanje su potvrdili i Stewart i sur. koji su u perifernoj krvi bolesnika u kojih je učinjeno više leukaferoza svaki slijedeći dan našli značajno smanjenje kako ukupnog broja CD34+ stanica, tako i udjela CD34+Thy-1+ stanica sakupljenih u jednoj leukaferozu.<sup>141</sup> U krvi i produktu leukaferoze na 1. dan sakupljanja nađen je veći udio CD34+Thy-1+ stanica, a

udio ovih stanica smanjuje se svaki slijedeći dan. Tako je primjerice median udjela CD34+Thy-1+ stanica prvog dana bio 22%, a četvrtog dana 16.6% ( $p=0,04$ ).<sup>141</sup> Rezultati tog istraživanja govore u prilog primjeni LVV jer se na taj način može s manjim brojem postupaka postići ne samo veći prinos stanica, već sakupiti i više nezrelijih CD34+ stanica koje se smatraju odgovornima za dugotrajnu repopulaciju koštane srži. Postupak leukaferenze treba započeti što je ranije moguće, tj. čim se u krvi nalazi dovoljan broj CD34+ stanica i u tom jednom postupku sakupiti što je više moguće CD34+ stanica.

### **5.9. Nedostaci primjene leukaferenze velikog volumena**

Uz brojne do sada navedene prednosti, ostaje još odgovoriti na pitanje može li se LVV primjeniti u svih bolesnika. Danas većina centara tijekom LVV udvostručuje ulazni protok krvi u stanični separator što omogućava obradu velikog volumena u prihvatljivom vremenskom razdoblju. Međutim, neki autori ističu da velik ulazni protok krvi koji zahtjeva LVV nije ostvariv u svih bolesnika. Tako su primjerice Moller i sur. našli veću učestalost tehničkih komplikacija kod LVV zbog velikog ulaznog protoka.<sup>102</sup> Oni nisu mogli postići potreban ulazni protok kod 4 od 7 bolesnika zbog problema vezanih uz protok krvi. Nedovoljan ulazni protok krvi u separator ometao je sakupljanje, a to je uzrokovalo smanjenje učinkovitosti sakupljanja. Pamos-Coelho i sur. koji su za LVV koristili velik ulazni protok (median 148 mL/min), morali su skratiti postupak u trećine bolesnika jer zbog neodgovarajućeg ulaznog protoka nisu mogli postići potrebno raslojavanje stanica u staničnom separatoru.<sup>98</sup> No druga istraživanja pokazuju da je velik protok krvi kroz stanični separator koji je potreban za postupak LVV ipak moguće postići kod većine bolesnika, pa i kod djece. U ovom je istraživanju ulazni protok također bio velik i to  $91,77 \pm 18,84$  mL/min, a kod nekih bolesnika čak 131 mL/min, ali za razliku od drugih istraživanja mi nismo imali problema s protokom i to najvjerojatnije zbog činjenice da su uvijek korišteni kateteri za aferezu.

Leukaferenza velikog volumena krvi može u bolesnika koji su mobilizirali veliki broj KMS u perifernu krv imati za posljedicu sakupljanje većeg broja CD34+

stanica od onog koji je potreban za transplantaciju, a to može povećati troškove zamrzavanja transplantata te zauzeti dragocjen i skup prostor u spremnicima za pohranu transplantata.

Jedan od nedostataka LVV je i trajanje postupka sakupljanja. Obrada većeg volumena koje omogućuje sakupljanje većeg broja stanica traje dulje, iako se maksimalno trajanje sigurne LVV tek treba odrediti. Standardna leukaferaza obično traje 3 do 4 sata, dok LVV podrazumjeva produženje trajanja postupka što pak može otežati organizaciju rada odjela za aferezu. Postupak je u ovom istraživanju prosječno trajao 5 sati, a to odgovara radnom vremenu odjela za aferezu kao i laboratorija koji provode kontrolu kvalitete produkta i zamrzavanje transplantata, što omogućuje primjenu LVV u svakodnevnom radu.

#### **5.10. Nuspojave leukaferaze velikog volumena**

Jedna od glavnih zamjerki LVV je što obrada većeg volumena krvi može povećati učestalost neželjenih reakcija. Primjena veće količine otopine citrata može uzrokovati poremećaj elektrolita, velika brzina protoka i produženo izlaganje krvi stranim ne-endotelnim površinama može aktivirati sustav zgrušavanja i komplementa, a smanjenje broja trombocita i primjena heparina može povećati rizik krvarenja.

Najčešće nuspojave leukaferaze jesu simptomi hipokalcemije uzrokovani infuzijom citrata. Pojava simptoma hipokalcemije proporcionalna je s količinom infundiranog ACD-A po kilogramu tjelesne težine bolesnika.<sup>112</sup> Tako su se, primjerice, simptomi hipokalcemije pojavili u čak 48% bolesnika koji su tijekom leukaferaze primali samo antikoagulantnu otopinu ACD-A, dočim je u bolesnika u kojih je korištena kombinacija heparina i manje količine ACD-A učestalost nuspojava bila od 18% do 39%.<sup>67, 68, 70, 102, 111</sup> Zbog tako visoke učestalosti simptoma hipokalcemije postavilo se pitanje nadoknade kalcija tijekom leukaferaze. Stoga su Buchta i sur.<sup>68</sup> evaluirali učinkovitost kontinuirane infuzije kalcija na toleranciju LVV. Oni su proveli dvostruko slijepo randomizirano istraživanje u kojem je tijekom LVV koja je trajala 4 sata jedna polovica bolesnika



primala kontinuiranu infuziju 500 mL fiziološke otopine s 357,5 mg kalcija, a druga polovica placebo, tj. infuziju samo 500 mL fiziološke otopine. Kontinuirana infuzija kalcija smanjila je pojavu simptoma hipokalcemije za 65%, pa su se oni javili u samo 17% bolesnika. Uz to, težina simptoma hipokalcemije u skupini koja je primala nadoknadu kalcija bila je slabija nego u placebo skupini. Primjena infuzije kalcija nije imala učinak na tehničko izvođenje LVV ili na učinkovitost sakupljanja. Rezultati istraživanja Bolana i sur. potvrđuju potrebu nadoknade kalcija. Naime, oni su u zdravih davatelja alogenih KMS našli smanjenje klinički značajnih parestezija u 96% bolesnika koji su primali kontinuiranu nadoknadu kalcija.<sup>165</sup> Iako rezultati ovih istraživanja ne ostavljaju mjesto sumnji je li tijekom LVV potrebna kontinuirana infuzija kalcija, ipak je još otvoreno pitanje doze kalcija koju treba primjeniti. Značajno veći udio bolesnika u Bolanovom istraživanju koji su dobro reagirali na infuziju kalcija najvjerojatnije je posljedica primjene dvostruko više doze kalcija od one koju su koristili Buchta i sur. (1 mmol Ca<sup>2+</sup> vs. 0,5 mmol Ca<sup>2+</sup>/10 mmol citrata). Valja osobito naglasiti potrebu primjene kalcija u bolesnicima s ukupnim volumenom krvi manjim od 4,5 L, jer je u njih opažena veća učestalost simptoma hipokalcemije nego u drugih bolesnika.<sup>68.</sup><sup>70</sup> U svjetlu dosadašnjih podataka o učestalosti simptoma hipokalcemije kao i našeg prethodnog iskustva s nadoknadom kalcija, svi naši bolesnici su tijekom LVV primali kontinuiranu infuziju kalcija.<sup>70</sup>

Svi naši bolesnici su postupak LVV dobro podnjeli pa niti jedan postupak nije bio prekinut prije planiranog vremena. Samo kod jedne bolesnice, kod koje je vrijednost kalcija i prije početka sakupljanja bila niža od normale, javili su se na početku leukaferoze blage parestezije koje su nestale nakon infuzije kalcija. Niska učestalost simptoma hipokalcemije u ovom istraživanju još je značajnija s obzirom na veliku količinu obrađene krvi i infundiranog citrata kod naših bolesnika.

LVV dovodi do značajnih promjena vrijednosti elektrolita u serumu.<sup>111</sup> Humpe i sur. su izvjestili da unatoč kontinuiranoj nadoknadi kalcija tijekom leukaferoze dolazi do smanjenja vrijednosti kalcija u serumu nakon LVV.<sup>111</sup>

Medijan vrijednosti kalcija nakon leukaferoze bio je na donjoj granici normale ili u blagoj hipokalcemiji, ali nije nađena korelacija između simptoma hipokalcemije i vrijednosti kalcija u serumu. I u našem su istraživanju vrijednosti kalcija u krvi nakon završetka LVV bile su statistički značajno niže nego prije početka, ali su i dalje ostale unutar referentnog intervala.

Osim smanjenja razine kalcija u serumu, leukaferoze uzrokuje i promjene drugih elektrolita, osobito kalija, magnezija i anorganskih fosfata. U našem su istraživanju nakon leukaferoze također nađene i značajno niže vrijednosti kalija, magnezija i anorganskog fosfata nego prije početka leukaferoze, a koje su se smanjile čak ispod referentnog intervala. No, niti u jednog našeg bolesnika nisu zabilježeni ni neurološki niti kardiološki simptomi koji bi bili uzrokovani smanjenjem vrijednosti elektrolita. Smanjenje vrijednosti ioniziranog magnezija tijekom leukaferoze posljedica je stvaranja kompleksa magnezij–citrat. Budući da povećana razina iona kalcija u krvi može kompetitivno smanjiti stvaranje kompleksa magnezij–citrat u korist kompleksa kalcij–citrat, moglo bi se očekivati da primjena infuzije kalcija bude jedan od pristupa stabilizaciji razine iona magnezija. U istraživanju Buchte i sur. nakon LVV došlo je do smanjenja vrijednosti magnezija za 9 do 12% u odnosu na početne vrijednosti.<sup>68</sup> Primjena kalcija nije pokazala učinak na stabilizaciju razine magnezija u serumu, budući da nije bilo razlike smanjenju koje je bilo jednako bez obzira jesu li bolesnici primali infuziju kalcija ili nisu. U istraživanju Bolana i sur., kao i u našem, nakon LVV došlo je do smanjenja vrijednosti magnezija za 11,9% u odnosu na početne vrijednosti.<sup>165</sup> Neki su autori zbog toga razmatrali i mogućnost nadoknade magnezija tijekom LVV.<sup>111</sup> Haddad i sur. su kod 30 zdravih davatelja proveli dvostruko slijepo istraživanje učinka kontinuirane infuzije magnezija.<sup>111</sup> Svi su davatelji tijekom LVV primili kontinuiranu infuziju kalcija u dozi 1,36 mg/kg/min. Jedna polovica davatelja je uz kalcij intravenski primila i magnezij (0,2 mg magnezija/mL ACD-A), a druga placebo. Vrijednosti magnezija u serumu su uz nadokadu magnezija ostale unutar referentnog intervala. Međutim i.v. primjena magnezija uz kontinuiranu profilaktičnu infuziju kalcija nije smanjila ni učestalost

niti težinu nuspojava u odnosu na skupinu koja je primala samo nadokandu kalcija. Stoga se danas smatra da tijekom LVV nije potrebno rutinski primjeniti infuziju magnezija.

Humpe i sur. su našli značajno smanjenje vrijednosti kalija nakon leukaferoze koje je bilo još izraženije nakon LVV.<sup>111</sup> Akutna hipokalemija je obično posljedica pomaka kalija iz ekstracelularne u intracelularnu tekućinu, a jedan od činitelja koji uzrokuje taj pomak je alkalozna. Istraživanje Humpea i sur. je pokazalo da tijekom leukaferoze dolazi do značajnog porasta pH krvi i suviška baza što objašnjava popratno smanjenje kalija.<sup>111</sup> Porast pH značajno korelira s količinom infundiranog ACD-A pa je kod LVV očekivano izraženije smanjenje kalija. I u naših je bolesnika nađena hipokalemija pa kao i Humpe i sur. smatramo da je peroralna nadoknada kalija dovoljna mjera za korekciju hipokalemije tijekom leukaferoze i treba ju primjeniti samo u bolesnika koji već prije početka leukaferoze imaju niže vrijednosti kalija .

Unatoč tome što je krv tijekom LVV izložena stranim ne-endotelnim površinama i velikoj brzini protoka, u istraživanju Humpea i sur. nije opažena aktivacija sustava koagulacije niti sustava komplementa.<sup>111</sup> Oni su prije i nakon leukaferoze određivali vrijednosti APTV i biljege aktivacije koagulacije: protrombin fragment 1 i 2 (PF1+2), trombin-antitrombin III kompleks (TAT), plasmin alfa2-antiplasmin kompleks (PAP) i faktor XIIa. Razinu heparina su pratili određivanjem aktivnosti anti-faktora Xa. Aktivaciju sustava komplementa su pratili određivanjem fragmenta iC3b koji je razgradni produkt fragmenta C3b te topljivog oblika terminalnog kompleksa komplementa SC5b-9. Unatoč izloženosti visokom protoku i površinama seta staničnog separatora, vrijednosti biljega aktivacije sustava zgrušavanja i sustava komplementa bile su ili nepromijenjene ili čak smanjene tijekom postupka leukaferoze. Smatra se da primjena heparina kao dodatnog antikoagulansa u LVV može biti korisna i može spriječiti aktivaciju kako koagulacije, tako i komplementa.<sup>166</sup>

Tijekom leukaferoze dolazi do značajnog pada broja trombocita, a primjena heparina tijekom LVV je dodatni faktor rizika za pojavu krvarenja.

Budući da bolesnici tijekom LVV primaju kombinaciju velike količine antikoagulantne otopine citrata i heparina očekivano dolazi do promjene u pokazateljima koagulacije. U ovom je istraživanju nakon LVV bila značajno snižena vrijednost protrombinskog vremena koje je ipak ostalo unutar referentnog intervala, dok su vrijednosti APTV-a bile produžene i izvan referentnog intervala. U istraživanju Humpea i sur. bolesnici su također imali vrijednosti APTV, a osobito aktivnost anti-faktora Xa izvan preporučenog terapijskog raspona.<sup>111</sup> Unatoč opaženim promjenama u pokazateljima koagulacije, nije bio niti jedan slučaj krvarenja tijekom LVV niti u našem kao niti u istraživanju Humpea i suradnika. Razlog tome je najvjerojatnije činjenica što se heparin u LVV primjenjuje u maloj količini i prekratko vremensko razdoblje da bi mogao izazvati klinički manifestne simptome u sustavu zgrušavanja. Prema našem mišljenju, kliničko praćenje i kontrola pokazatelja koagulacije 2 sata nakon leukaferoze, što približno odgovara poluživotu eliminacije nefrakcioniranog heparina, bi uz određivanje broja trombocita nakon afereze trebala biti dovoljna mjera nadzora nad eventualnim promjenama u sustavu zgrušavanja. Osim toga smatramo da bi nakon leukaferoze trebalo načiniti kontrolu broja trombocita. U slučaju donošenja odluke o transfuziji trombocita nakon LVV treba razmotriti i nalaze koagulacije. U bolesnika koji su prethodno imali poremećaje u sustavu zgrušavanja, zbog smanjenja rizika krvarenja, u obzir dolazi i individualno prilagođeno ili laboratorijski kontrolirano doziranje heparina koje se već primjenjuje u drugim vrstama izvantjelesne cirkulacije.

Budući da stanični separator uz mononuklearne stanice sakuplja i dio trombocita koji se nalaze u istom sloju stanica, za očekivati je da nakon LVV dolazi do smanjenja broja trombocita u krvi. Broj trombocita u krvi se smanjuje proporcionalno s produženjem trajanja postupka leukaferoze pa je u više istraživanja utvrđena trombocitopenija nakon leukaferoze.<sup>111</sup> Nakon leukaferoze tijekom koje je obrađeno 13 L krvi u zdravih davatelja, smanjenje broja trombocita iznosilo je od 33 do 41%.<sup>79, 167</sup> U bolesnika je tijekom obrade 4 volumena krvi opaženo smanjenje broja trombocita za 50%.<sup>111</sup> Prema rezultatima

istraživanja Rowleya i sur. obradom svakog volumena krvi broj trombocita u krvi se smanjuje za 10%.<sup>79</sup> Naše istraživanje je pokazalo da na stupanj trombocitopenije na kraju LVV utječe kako ukupan volumen obrađene krvi, tako i inicijalni broj trombocita prije početka LVV. Budući da je ovo istraživanje pokazalo da LVV prati značajni gubitak trombocita, i to čak za 50% vrijednosti prije leukaferenze, svakako se treba pridržavati preporuka da bolesnici prije leukaferenze imaju najmanje  $30 \times 10^9/L$  trombocita.<sup>168</sup>

Iako je tijekom leukaferenze opažen pad vrijednosti hematokrita u perifernoj krvi bolesnika, taj pad nije bio i klinički značajan. Niti jedan bolesnik nakon leukaferenze nije trebao transfuziju eritrocita. To govori u prilog kvaliteti staničnih separatora koji se danas koriste i njihovoj sposobnosti da izdvoje samo željene mononuklearne stanice.

#### **5.11. Mjesto leukaferenze velikog volumena u sakupljanju transplantata KMS**

Postavlja se pitanje ima li i gdje je mjesto LVV u svakodnevnom radu. Budući da postupak LVV omogućuje sakupljanje većeg broja CD34+ stanica nego standardna leukaferenza, što pokazuju rezultati većine dosada provedenih istraživanja kao i svega iznesenog u ovom istraživanju smatramo da postupak LVV treba razmotriti kao metodu izbora sakupljanja KMS u bolesnika s malignim bolestima, i to osobito onih koji su u krv mobilizirali mali broj CD34+ stanica, kao i u bolesnika s multiplim mijelomom. Učinkovito i sigurno sakupljanje KMS postupkom LVV doprinosi udobnosti bolesnika, smanjuje nepotrebno izlaganje rizicima višekratnih leukaferenza te smanjuje ekonomske troškove sakupljanja KMS kao i troškove poslijetransplantacijske skrbi.

## 6. ZAKLJUČCI

Sakupljanje KMS postupkom leukaferoze velikog volumena krvi (LVV) jest učinkovit i siguran postupak. Na osnovi rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Između ukupnog prinosa CD34+ stanica i broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukaferoze postoji značajna linearna korelacija. Kumulativni prinos CD34+ stanica značajno se povećava obradom svakog dodatnog volumena krvi tijekom cijelog postupka LVV, a porast kumulativnog prinosa jednak je kod svih bolesnika bez obzira na stupanj mobilizacije CD34+ stanica i dijagnozu.
2. Dinamika promjene broja stanica u perifernoj krvi pokazuje da nakon LVV dolazi do značajnog smanjenja broja leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica. Međutim, CD34+ stanice se ne iscrpe u cijelosti pa se trajanje leukaferoze još eventualno može i produžiti.
3. Iako su učinkovitost sakupljanja i prinos CD34+ stanica zbog tehničkih osobitosti postupka manji tijekom obrade prvog volumena krvi, u daljnjem tijeku LVV stanični separator s jednakom učinkovitošću sakuplja CD34+ stanice i nema promjene prinosa. Valja osobito naglasiti ovu stabilnost prinosa CD34+ stanica tijekom cijele leukaferoze, unatoč smanjenju broja CD34+ stanica u krvi.
4. Većina CD34+ stanica u produktu leukaferoze istodobno izražava biljege CD38, HLA-DR ili CD33 koji su znak usmjerenosti matične stanice u krvne loze. Ako se postupak LVL produži s obrade četiri na obradu šest volumena krvi, nema promjene kvalitete produkta leukaferoze s obzirom na subpopulacije CD34+ stanica kao i na klonogenu sposobnost sakupljenih usmjerenih krvotvornih stanica izraženu kao brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija. To upućuje da je kvaliteta produkta ista tijekom cijelog postupka i da ima smisla obraditi i ovako veliki volumen krvi jer se stanice važne za dugotrajnu repopulaciju koštane srži kao i za brzi hematološki oporavak neće iscrpiti iz krvi tijekom postupka LVV.
5. Tijekom leukaferoze dolazi do dodatnog novačenja CD34+ stanica i mononuklearnih stanica iz koštane srži u krvi, a izostaje novačenje granulocita i trombocita. Sakupljanje trostruko većeg broja CD34+ stanica nego što ih je bilo u

krvi na početku ukazuje da se one tijekom LVV otpuštaju i iz drugih ekstravaskularnih rezervoara, iako postupno smanjenje njihovog broja u krvi upućuje da se otpuštaju sporijom brzinom nego ih uklanja stanični separator.

6. U bolesnika koji su loše mobilizirali CD34+ stanice u perifernu krv, faktor novačenja je značajno veći nego u dobrim mobilizatorima bez obzira na dijagnozu. U tih je bolesnika i u perifernoj krvi nakon leukaferoze značajno manje izraženo smanjenje broja CD34+ stanica nego u dobrim mobilizatorima, što je vjerojatno posljedica većeg novačenja CD34+ stanica. To potvrđuje važnost primjene LVV u skupini bolesnika loših mobilizatora jer se u njih može smanjiti broj postupaka leukaferoze potrebnih za sakupljanje transplantata KMS.

7. Obradom 6 volumena krvi značajno se smanjuje broj leukaferaza potrebnih za sakupljanje dovoljnog broja stanica za transplantaciju. Prinos CD34+ stanica tijekom obrade ukupno 6 volumena krvi značajno je veći u odnosu na obradu ukupno 4 volumena krvi. U bolesnika s multiplim mijelomom postupak LVV povećava mogućnost sakupljanja dovoljnog broja CD34+ stanica potrebnih za liječenje dvostrukom transplantacijom samo jednim postupkom leukaferoze.

8. Obrada velikog volumena krvi uzrokuje značajno smanjenje vrijednosti elektrolita, osobito kalcija i kalija, kao i koagulacijskih pokazatelja. Broj trombocita u krvi smanjuje se proporcionalno s trajanjem postupka i nakon LVV iznosi 50% početne vrijednosti. Unatoč opaženim laboratorijskim promjenama, primjena kontinuirane infuzije kalcija omogućuje sigurno izvođenje postupka LVV bez nuspojava.

9. Postupak LVV treba razmotriti kao metodu izbora sakupljanja KMS u bolesnika s malignim bolestima, i to osobito onih koji su u krv mobilizirali mali broj CD34+ stanica, kao i u bolesnika s multiplim mijelomom. Učinkovito i sigurno sakupljanje KMS postupkom LVV doprinosi udobnosti bolesnika, smanjuje nepotrebno izlaganje rizicima višekratnih leukaferaza te smanjuje ekonomske troškove sakupljanja KMS kao i troškove poslijetransplantacijske skrbi.

## 7. SAŽETAK

S obzirom na dosadanašnje spoznaje o sakupljanju krvotvornih matičnih stanica (KMS) iz krvi, u ovom je radu prospektivno ispitana učinkovitost i sigurnost postupka lekaferenze velikog volumena (LVV). Istraženo je kako na učinkovitost i kvalitetu sakupljanja KMS utječe obrada šest ukupnih volumena krv u odnosu na standardna četiri volumena krvi te može li se na taj način samo jednim postupkom leukaferenze sakupiti transplantat. Učinkovitim sakupljanjem KMS tijekom samo jednog postupka leukaferenze uz prihvatljivu učestalost nuspojava izbjeglo bi se nepotrebno izlaganje bolesnika rizicima višekratnih leukaferenza, smanjili troškovi i omogućilo planiranje rada jedinice za aferezu. U istraživanju je sudjelovalo 30 bolesnika s hematološkim zloćudnim bolestima u kojih je mobilizacija KMS-a u perifernu krv potaknuta primjenom kombinacije različitih citostatika i G-CSF. U svih bolesnika su učinjene LVV i produkt je sakupljan uzastopno u 6 vrećica, a u svaku od njih su sakupljane stanice tijekom obrade jednog ukupnog volumena krvi. U istraživanju su praćeni i analizirani pokazatelji uspješnosti sakupljanja, dinamika promjene pokazatelja u krvi i produktu leukaferenze te kvaliteta sakupljenih stanica.

Postupkom LVV uspješno se sakuplja transplantat KMS. Između ukupnog prinosa CD34+ stanica i broja CD34+ stanica u krvi prije leukaferenze postoji značajna linearna korelacija. Kumulativni prinos CD34+ stanica značajno se povećava nakon obrade svakog dodatnog volumena krvi tijekom cijelog postupka LVV. Nakon LVV dolazi do značajnog smanjenja broja leukocita, mononuklearnih i CD34+ stanica u perifernoj krvi, ali se CD34+ stanice ne iscrpe u cijelosti pa se trajanje leukaferenze još eventualno može produžiti. Iako su učinkovitost sakupljanja i prinos CD34+ stanica zbog tehničkih osobitosti postupka manji tijekom obrade prvog volumena krvi, u daljenjem tijeku LVV stanični separator s jednakom učinkovitošću sakuplja CD34+ stanice i nema promjene prinosa. Valja osobito naglasiti ovu stabilnost prinosa CD34+ stanica tijekom cijele LVV, unatoč smanjenju broja CD34+ stanica u krvi.



Tijekom LVV dolazi i do dodatnog novačenja CD34+ stanica i mononuklearnih stanica iz koštane srži u perifernu krv, a izostaje novačenje granulocita i trombocita. Sakupljanje trostruko većeg broja CD34+ stanica nego što ih je bilo u krvi na početku leukaferoze ukazuje da se te stanice tijekom LVV otpuštaju i iz drugih ekstravaskularnih rezervoara. U bolesnika koji su loše mobilizirali CD34+ stanice, faktor novačenja je značajno veći nego kod dobrih mobilizatora bez obzira na njihovu dijagnozu. U istraživanju je dokazano da ako se obrada produži sa standardna četiri na šest volumena krvi, tada nema promjene u kvaliteti produkta leukaferoze s obzirom na subpopulacije CD34+ stanica kao i na klonogenu sposobnost sakupljenih usmjerenih krvotvornih stanica izraženu kao brojnost CFU-GM, BFU i CFU-MIX kolonija. To upućuje da je kvaliteta produkta ista tijekom cijelog postupka i da ima smisla obraditi i ovako veliki volumen krvi jer se stanice važne za dugotrajnu repopulaciju koštane srži kao i za brzi hematološki oporavak neće iscrpiti iz krvi tijekom postupka LVV. Obradom šest volumena krvi značajno se smanjuje broj leukaferoze potrebnih za sakupljanje dovoljnog broja stanica za transplantaciju. Postupak LVV u bolesnika s multiplim mijelomom olakšava sakupljanje dovoljnog broja CD34+ stanica potrebnih za liječenje dvostrukom transplantacijom.

Obrada velikog volumena krvi uzrokuje značajno smanjenje vrijednosti elektrolita, osobito kalcija i kalija, kao i koagulacijskih pokazatelja. Broj trombocita u krvi se smanjuje proporcionalno s trajanjem postupka i nakon LVV iznosi 50% početne vrijednosti. Unatoč opaženim laboratorijskim promjenama, primjena kontinuirane infuzije kalcija omogućuje sigurno izvođenje postupka LVV bez nuspojava.

Postupak LVV treba razmotriti kao metodu izbora za sakupljanje KMS u bolesnika s malignim bolestima, i to osobito onih koji su u krv mobilizirali mali broj CD34+ stanica, kao i u bolesnika s multiplim mijelomom. Učinkovito i sigurno sakupljanje KMS postupkom LVV doprinosi udobnosti bolesnika, smanjuje nepotrebno izlaganje rizicima višekratnih leukaferoze te smanjuje ekonomske troškove sakupljanja KMS kao i troškove poslijetransplantacijske skrbi.

## 8. SUMMARY

### Peripheral blood stem cell collection by large volume leukapheresis procedure

The amount of transplanted CD34+ cells is the most important predictor for safe engraftment after high dose chemotherapy and it is crucial to collect as many peripheral blood stem cells (PBSC) during leukapheresis procedure. Large-volume leukapheresis (LVL) differs from normal-volume leukapheresis by increased blood flow and altered anticoagulation regimen. The main question is, to what degree a further extension of duration of apheresis procedure is reasonable in terms of higher cell yields and safety of the procedure.

The present study analyzed 30 LVL procedures for patients with haematologic malignancies. In all LVL procedures six total blood volumes (TBV) were processed by extending the duration of the procedure and by twofold increasing the inlet flow rate. The yield of CD34+ cells increased continuously during LVL and up to 6 times the patients' TBV were processed safely without serious side effects. LVL resulted in a higher yield of CD34+ cells and an intraapheresis recruitment of PBSC but the relative composition of the harvested CD34+ cells was not changed significantly. Although a median platelet loss of 50% can be expected, LVL is safe procedure and can be recommended as the standard apheresis method for PBPC collection in patients with malignant diseases. LVL is particularly useful in patients who mobilize low number of CD34+ cells into the peripheral blood and in patients with multiple myeloma.

## 9. LITERATURA

1. Thomas ED, Storb R. The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies. U: Thomas E, Storb Blume K, Forman S, ur. Hematopoietic cell transplantation. Malden: Blachwell Scientific Inc.; 1998, str.1-11.
2. Goodman GE, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19:702-14.
3. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971;171:293-4.
4. McCarthy DM, Goldman JM. Transfusion of circulating stem cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1984;20:1-24.
5. Weiner RS, Richman CM, Yankee RA. Semicontinuous flow centrifugation for the pheresis of immunocompetent cells and stem cells. *Blood* 1977;49:391-7.
6. Reiffers J, Bernard P, David B. Successful autologous transplantation with peripheral blood hematopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* 1986;14:312-5.
7. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Wisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cell. *Exp Hematol* 1986;14:192-6.
8. Korbling M, Dorken B, Ho AD i sur. Autologous transplantation of blood derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-32.
9. Kessinger A, Smith DM, Strandjord SW i sur. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1989;4:643-6.
10. Dreger P, Suttorp M, Haferlach T i sur. Allogeneic granulocyte colony-stimulatnig factor-mobilized peipheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood* 1993;81:1404-9.

11. Besinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR i sur. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulated factor. *Blood* 1995;85:1655-8.
12. Korbling M, Przepiorka D, Huh YO i sur. Allogeneic blood cell transplantation for leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 1995;85:1659-65.
13. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood* 1995;85:1666-72.
14. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:607-20.
15. Baron MH, Fraser ST. The specification of early hematopoiesis in the mammal. *Curr Opin Hematol* 2005;12:217-21.
16. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throught life. *Cell* 2008;132:598-611.
17. Levesque JP, Winkler I. Mobilization of hematopoietic stem cell: state of the art. *Curr Opin Organ Tran* 2008;13:53-8.
18. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006;441:1060.
19. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 2006;169:338-46.
20. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration fo the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.
21. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7-25.
22. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006;116:1195-201.
23. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW i sur. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;23:841-6.

24. Kollet O, Dar A, Shivtiel S i sur. Osteoclast degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 2006;12:657-64.
25. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T i sur. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell Tissue Kinet* 2005;121:1109-21.
26. Kiel M, Morrison SJ. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity* 2006;862-4.
27. 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;25:977-88.
28. Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2009;4:27-36.
29. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:327-36.
30. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG i sur. Human bone marrow CD34<sup>-</sup> cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34<sup>+</sup> cells. *Exp Hematol* 1998;26:353-60.
31. Bonde J, Hess DA, Nolte JA. Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol* 2004;11:392-8.
32. Goodell MA. CD34<sup>+</sup> or CD34<sup>-</sup>: does it really matter? *Blood* 1999;94:2545-7.
33. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548-54.
34. Serafini M, Veraille CM. Pluripotency in adult stem cells: State of the art. *Semin Reprod Med* 2006;24:379-88.
35. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K i sur. Results of the EBMT activity survey 2006 on hematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:687-705.

36. Gratwohl A, Baldomero H, Schwenderer A i sur. The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapies. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:275-91.
37. Socinski MA, Cannistra AS, Elias A i sur. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in humans. *Lancet* 1989;1:1194-8.
38. To LB, Shepperd KM, Haylock DN i sur. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* 1990;18:442-7.
39. Moog R. Management strategies for poor peripheral blood stem cell mobilization. *Transfus Apher Sci* 2008;38:229-36.
40. van der Ham AC, Benner R, Vos O. Mobilization of B and T lymphocytes and haematopoietic stem cells by polymethacrylic acid and dextran sulphate. *Cell Tissue Kinet* 1977;10:387-97.
41. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9374-8.
42. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976;47:1031-9.
43. Herrmann F, Schulz G, Lindemann A i sur. Hematopoietic responses in patients with advanced malignancy treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Clin Oncol* 1989;7:159-67.
44. Filshie R. Cytokines in haemopoietic progenitor mobilization for peripheral blood stem cell transplantation. *Curr Pharm Design* 2002;8:379-94.
45. Cavallaro AM, Lilley K, Majolini I i sur. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:85-9.
46. Pelus LM, Bian H, Fukuda S i sur. The CXCR4 agonist peptide, CTCE-0021, rapidly mobilizes polymorphonuclear neutrophils and hematopoietic

progenitor cells into peripheral blood and synergizes with granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 2005;33:295-307.

47. Semerad CL, Christopher MN, Liu F i sur. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005;106:3020-7.

48. Kronenwett R, Martin S, Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 2000;18:320-30.

49. Ciavarella D. PBSC collection characteristics. U: Kessinger A, McMannis J, ur. Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation Lakewood: COBE BCT; 1994, str.25-34.

50. Hill GR, Morris ES, Fuery M i sur. Allogeneic stem cell transplantation with peripheral blood stem cells mobilized by pegylated G-CSF. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:603-7.

51. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E i sur. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 2003;102:2728-30.

52. Fruehauf S, Seeger T, Maier P i sur. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp Hematol* 2006;34:1052-9.

53. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP i sur. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001;294:1933-6.

54. Katayama Y, Battista M, Kao WM i sur. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006;124:407-21.

55. Adams GB, Martin RP, Alley IR i sur. Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat Biotechnol* 2007;25:238-43.

56. Ballen KK, Shpall EJ, Avigan D i sur. Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:838-43.

57. Singh V, Krishnamurthy J, Duffey S i sur. Actual or ideal body weight to calculate CD34+ cell dose in patients undergoing autologous hematopoietic SCT for myeloma? *Bone Marrow Transplant* 2009;43:301-5.
58. Bender JG, Williams SF, Myers S i sur. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:281-5.
59. Bender JG, To LB, Williams SF, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992;1:329-41.
60. Schulman KA, Birch R, Zhen B i sur. Effect of CD34+ cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol* 1999;17:1227-33.
61. Fabritiis P, Gonzalez M, Meloni G i sur. Monitoring of CD34+ cells during leukapheresis allows a single, successful collectin of hemopoietic progenitors in patients with low numbers of circulating stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1229-36.
62. Haire WD, Lieberman RP, Lund GB i sur. Translumbar inferior vena cava catheters: safety and efficacy in peripheral blood stem cel transplantation. *Transfusion* 1990;30:511-5.
63. Stephens L, Haire W, Tarantolo S i sur. Normal saline versus heparin flush for maintaining central venous catheter patency during apheresis collection of peripheral blood stem cells (PBSC). *Transfus Sci* 1997;18:187-93.
64. Thompson L. Central venous catheters for apheresis. *J Clin Apheresis* 1992;7:154-7.
65. Haire WD, Edney JA, Landmark JD, Kessinnger A. Thrombotic complications of subclavian apheresis catheters in cancer patients: prevention with heparin infusion. *J Clin Apheresis* 1990;5:188-91.
66. Haire WD, Lynch TG, Lieberman RP, Edney JA. Duplex scans before subclavian vein catheterization predict unsuccessful catheter placement. *Arch Surg* 1992;127:229-30.



67. Reik RA, Noto TA, Fernandez HF. Safety of large-volume leukapheresis for collection of peripheral blood progenitor cells. *J Clin Apheresis* 1997;12:10-3.
68. Buchta C, Macher M, Bieglmayer C i sur. Reduction of adverse reactions during autologous large-volume PBSC apheresis by continuous infusion of calcium-gluconate. *Transfusion* 2003;43:1615-21.
69. Hester JP, Ayyar R. Anticoagulation and electrolytes. *J Clin Apheresis* 1984;2:41-51.
70. Golubić Ćepulić B, Bojanić I, Plenković F i sur. Adverse events in collection of peripheral blood hematopoietic progenitor cells during five year period *Bone Marrow Transplant* 2000;25 (Supp I):S877.
71. Haire W, Sniecinski I. Venous access, anticoagulation and patient care during apheresis. U: Kessinger A, McMannis J, ur. *Practical consideration of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation Lakewood: COBE BCT; 1994, str.11-24.*
72. Dzik WH, Kirkley SA. Citrate toxicity during massive blood transfusion. *Transfus Med Rev* 1988:76-94.
73. Vodič za kvalitetu i sigurnost u transplantaciji organa, tkiva i stanica. 3. izd. Europe NV. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi; 2007: str. 56-58.
74. Lasky LC, Smith JA, McCullough J, Zanjani ED. Three-hour collection of committed and multipotent hematopoietic progenitor cells by apheresis. *Transfusion* 1987;27:276-8.
75. Rowley S. Analysis of collected product. U: Kessinger A, McMannis J, ur. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation. 1. izd. Lakewood: COBE BCT; 1994, str.35-51.*
76. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Pediatr Croat* 2006;50:176-82.
77. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M i sur. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5:213-26.

78. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K i sur. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry 1998;34:61-70.
79. Rowley SD, Yu J, Gooley T i sur. Trafficking of CD34+ cells into the peripheral circulation during collection of peripheral blood stem cells by apheresis. Bone Marrow Transplant 2001;28:649-56.
80. Standardi za prikupljanje, obradu i presađivanje hematopoetskih progenitorskih stanica. 2. izd. JACIE. 2005. [www.jacie.org](http://www.jacie.org).
81. Golubić Čepulić B, Bojanić I, Vukičević I i sur. Quality control is essential for prevention of bacterial contamination of bone marrow and peripheral blood stem cell grafts. Vox Sang 2000;78 (Suppl. 1):S683.
82. Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cell. Blood 1990;76:1879-89.
83. Brenner MK, Rill DR, Moen RC i sur. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. Lancet 1993;341:85-6.
84. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D i sur. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. N Engl J Med 1991;325:1525-33.
85. Moss TJ, Ross AA. The risk of tumor cell contamination in peripheral blood stem cell collections. J Hematother 1992;1:225-32.
86. Brugger W, Bross KJ, Glatt M i sur. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. Blood 1994;83:636-40.
87. Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA i sur. Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortend relapse-free survival after transplantation. Bone Marrow Transplant 1997;19:337-42.

88. Diaz MA, Kanold J, Vincent MG i sur. Using paripheral blood progenitor cells for transplantation in pediatric patients: a state-of-the-art review. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1291-8.
89. Murea S, Goldschmidt H, Hahn U i sur. Successful collection and transplantation of peripheral blood stem cells in cancer patients using large-volume leukaphereses. *J Clin Apheresis* 1996;11:185-94.
90. Humpe A, Riggert J, Munzel U i sur. A prospective, randomized, sequential, crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effect on progenitor cells and engraftment. *Transfusion* 1999;39:1120-7.
91. Gorlin JB, Vamvakas EC, Cooke E i sur. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: processing more blood diminishes the apparent magnitude of intra-apheresis recruitment. *Transfusion* 1996;36:879-85.
92. Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM. Increase in circulating colony-forming units-granulocyte-macrophage during large-volume leukapheresis: evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 1991;31:327-32.
93. Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD i sur. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* 1992;32:732-5.
94. Gasová Z, Marinov I, Vodvářková S i sur. PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients. *Transfus Apher Sci* 2005;32:167-76.
95. Bojanić I, Golubić B, Plenković F i sur. Influence of leukapheresis volume on the number of harvested peripheral blood hematopoietic progenitor cells. Abstract book of VIII European Congress of the International Society of Blood Transfusion, Istanbul 2003:P 206.
96. Bolin RB, Stewart DA, Cheney BA i sur. Granulocyte progenitor cell (CFUC) harvest by continuous apheresis in dogs. Effects of blood volume and lithium on yields. *Exp Hematol* 1983;11:226-30.

97. Hillyer CD, Lackey DA 3rd, Hart KK i sur. CD34+ progenitors and colony-forming units-granulocyte macrophage are recruited during large-volume leukapheresis and concentrated by counterflow centrifugal elutriation. *Transfusion* 1993;33:316-21.
98. Passos-Coelho JR, Braine HG, Davis JM, Huelskamp AM. Predictive factors for peripheral- blood -progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony stimulating factor mobilization. *J Clin Oncol* 1995;13:705-14.
99. Cassens U, Ostkamp-Ostermann P, van der Werf N i sur. Volume-dependent collection of peripheral blood progenitor cells during large-volume leukapheresis for patients with solid tumours and haematological malignancies. *Transfus Med* 1999;9:311-20.
100. Humpe A, Riggert J, Meineke I i sur. A cell-kinetic model of CD34+ cell mobilization and harvest: development of a predictive algorithm for CD34+ cell yield in PBPC collections. *Transfusion* 2000;40:1363-70.
101. Bojko P, Scharifi M, Stössel K, Seeber S. Comparison of processing four and five times the patients' blood volume during peripheral blood stem cell collection and analysis of CD34+38-and CD34+49d+ subsets during apheresis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:19-28.
102. Moller AK, Dickmeiss E, Geisler CH, Christensen LD. Recruitment of CD34+ cells during large-volume leukapheresis. *J Hematol Stem Cell* 2001;10:837-53.
103. Monacada V, Bolan C, Yau YY, Leitman SF. Analysis of PBPC cell yields during large-volume leukapheresis of subjects with a poor mobilization response to filgrastim. *Transfusion* 2003;43:495-501.
104. Smolowicz AG, Villman K , Tidefelt U. Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. *Transfusion* 1997;37:188-92.
105. Smolowicz AG, Villman K, Berlin G, Tidefelt U. Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis. *Transfusion* 1999;39:403-9.

106. Yamaguchi E, Yamato K, Miyata Y. Kinetics of peripheral blood stem cell collection in large-volume leukapheresis for pediatric patients undergoing chemotherapy and adult patients before chemotherapy. *J Hematother Stem Cell Research* 2000;9:565-72.
107. Hillyer CD, Swenson RB, Hart KK i sur. Peripheral blood stem cell acquisition by large-volume leukapheresis in growth factor-stimulated and unstimulated rhesus monkeys: development of an animal model. *Exp Hematol* 1993;21:1455-9.
108. Kobbe G, Soehngen D, Heyll A i sur. Large volume leukapheresis maximizes the progenitor cell yield for allogeneic peripheral blood progenitor donation. *J Hematother* 1997;6:125-31.
109. Cecyn KZ, Seber A, Ginani VC i sur. Large volume leukapheresis for peripheral blood progenitor cell collection in low body weight pediatric patients: A single center experience. *Transfus Apher Sci* 2005;32:269-74.
110. Lin JS, Burgstaler EA, Pineda AA, Gertz MA. Effects of whole blood flow rates on mononuclear cell yields during peripheral blood stem cell collection using Fenwal CS 3000 Plus. *J Clin Apheresis* 1995;10:7-11.
111. Humpe A, Riggert J, Munzel U, Köhler M. A prospective, randomized, sequential crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effects on serum electrolytes, platelet counts, and other coagulation measures. *Transfusion* 2000;40:368-74.
112. Bolan CD, Leitman SF. Management of anticoagulation-associated toxicity during large-volume leukapheresis of peripheral blood stem cell donors *Blood* 2002;99:1878.
113. Knudsen LM, Nikolaisen K, Gaarsdal E, Johnsen HE. Kinetic studies during peripheral blood stem cell collection show CD34+ cell recruitment intra-apheresis. *J Clin Apheresis* 2001;16:114-9.
114. Barlogie B, Shaughnessy J, Epstein J i sur. Plasma cell myeloma. U: Lichtman M, Beutler E, Kipps T i sur. , ur. *Williams Hematology*. 7. izd. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2006, str.1501-33.

115. Aurer I, Dominis M, Štern-Padovan R i sur. Dijagnostika i liječenje limfoma - hrvatski konsenzus. *Liječ Vjesn* 2007;129:111-7.
116. Foon KA, Ghobrial I, Geskin LJ, Jacobs SA. The non-Hodgkin lymphomas. U: Lichtman M, Beutler E, Kipps T i sur. , ur. *Williams Hematology*. 7. izd. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2006, str.1407-59.
117. Horning SJ. Hodgkin lymphoma. U: Lichtman M, Beutler E, Kipps T i sur. , ur. *Williams Hematology*. 7 izd. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2006, str.1461-99.
118. National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (AE), Version 3.0 (CTCAE): dostupno na URL: [http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae3.pdf](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf).
119. Smalcelj R, Kusec V, Thune S, Petrovecki M. Circulating hematopoietic progenitors are not altered in patients with post-transplant erythrocytosis. *Haematologica* 1998;83:948-9.
120. Cull G, Ivey J, Chase P i sur. Collection and recruitment of CD34+ cells during large-volume leukapheresis. *J Hematother* 1997;6:309-14.
121. Ivanković D, i sur. . *Osnove statističke analize za medicinare*. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1991.
122. Ford CD, Greenwood J, Strupp A, Lehman CM. Change in CD34+ cell concentration during peripheral blood progenitor cell collection: effects on collection efficiency and efficacy. *Transfusion* 2002;42:904-11.
123. Basquiera AL, Abichain P, Damonte JC i sur. The number of CD34+ cells in peripheral blood as predictor of the CD34+ yield in patients going to autologous stem cell transplantation. *J Clin Apheresis* 2006;21:92-5.
124. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N i sur. Circulating CD34+ absolute cell number is the best single parameter to predict the quality of leukapheretic yield. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:215-6.

125. Mohle R, Murea S, Pförsich M i sur. Estimation of progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD34+ cells in the peripheral blood. *Vox Sang* 1996;71:90-6.
126. Bojko P, Stellberg W, Küdde C i sur. Kinetic study of CD34+ cells during peripheral blood stem cell collections. *J Clin Apher* 1999;14:18-25.
127. Abe T, Makimoto A, Kawano Y i sur. Intra-apheresis recruitment of blood progenitor cells in children. *Transfusion* 1998;38:944-50.
128. Cassens U, Barth IM, Baumann C i sur. Factors affecting the efficacy of peripheral blood progenitor cells collections by large-volume leukaphereses with standardized processing volumes. *Transfusion* 2004;44:1593-602.
129. Cassens U, Momkvist PH, Zuehlsdorf M i sur. Kinetics of standardized large volume leukapheresis in patients do not show a recruitment of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:13-20.
130. Vermeulen M, Le Pasteur F, Gagnerault MC i sur. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1998;92:894-900.
131. Inaba T, Shimazaki C, Tatsumi T i sur. Expression of differentiation-associated antigens and adhesion molecules on CD34-positive cells harvested from peripheral blood and bone marrow. *Prog Clin Biol Res* 1994;389:331-7.
132. Rumi C, Ruttela S, Teofili L i sur. RhG-CSF-mobilized CD34+ peripheral blood progenitors are myeloperoxidase-negative and noncycling irrespective of CD33 or CD13 coexpression. *Exp Hematol* 1997;25:245-51.
133. Inaba T, Shimazaki C, Hirata T i sur. Phenotypic differences of CD34-positive stem cells harvested from peripheral blood and bone marrow obtained before and after peripheral blood stem cell collection. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:527-32.
134. D'Arena G, Cascavilla N, Musto P i sur. Flow cytometric characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow cancer patients *Haematologica* 1996;81:216-23.

135. Henon P, Sovalat H, Becker M i sur. Primordial role of CD34+38- cells on early and late trilineage haematopoietic engraftment after autologous blood cell transplantation. *Br J Haematol* 1998;103:568-81.
136. Terstappen LW, Huang S, Safford M i sur. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991;77:1218-27.
137. Stewart DA, Guo D, Luider J i sur. Factors predicting engrftment of autologous blood stem cells: CD34+ subsets inferior to the total CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1237-43.
138. Beach J, Johnsen HE. Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification. *Stem Cells* 2000;18:76-86.
139. Humpe A, Riggert J, Koch S i sur. Prospective, randomized, sequential, crossover trial of large-volume vs. normal volume leukapheresis procedures: effects on subpopulations of CD34+ cells. *J Clin Apheresis* 2001;16:109-13.
140. Haas R, Mohle R, Pforsich M i sur. Blood-derived autografts collected during granulocyte-colony-stimulating factor-enhanced recovery are enriched with early Thy-1+hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995;85:1936-43.
141. Stewart AK, Imrie K, Keating A i sur. Optimizing the CD34+ and CD34+Thy-1+ stem cell content of peripheral blood collections. *Exp Hematol* 1995;23:1619-27.
142. Gillespie GW, Hillyer CD. Peripheral blood progenitor cells for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies. *Transfusion* 1996;36:611-24.
143. Benjamin RJ, Linsley L, Fountain D i sur. Preapheresis peripheral blood CD34+ mononuclear cell counts as predictos of progenitors of progenitor cell yield. *Transfusion* 1997;37:79-85.
144. Bolan CD, Carter CS, Wesley RA i sur. Prospective evaluation of cell kinetics, yields and donor experiences during a single large-volume apheresis versus two smaller volume consecutive day collections of allogeneic peripheral blood stem cells. *Br J Haematol* 2003;120:801-7.



145. Torrabadella M, Olivé T, Ortega J J, Massuet L. Enhanced HPC recruitment in children using LVL and a new automated apheresis system. *Transfusion* 2000;40:404-10.
146. Comenzo RL, Michelle D, LeBlanc M i sur. Mobilized CD34+ cells selected as autografts in patients with primary light-chain amyloidosis: rationale and application. *Transfusion* 1998;38:60-9.
147. Heyns AD, Badenhorst PN, Lotter MG i sur. Kinetics and mobilization from the spleen of indium-111-labeled platelets during platelet apheresis. *Transfusion* 1985;25:215-8.
148. Lee EJ, Schiffer CA. Evidence for rapid mobilization of platelets from the spleen during intensive plateletpheresis. *Am J Haematol* 1985;19:161-5.
149. Barrett AJ, Longhurst P, Sneath P, Watson JG. Mobilization of CFU-C by exercise and ACTH induced stress in man. *Exp Hematol* 1978;6:590-4.
150. Mohle R, Haas R, Hunstein W. Expression of adhesion molecules and c-kit on CD34+ hematopoietic progenitor cells: Comparison of cytokine mobilized blood stem cells with normal bone marrow and peripheral blood. *J Hematother* 1993;2:483-9.
151. Kuijpers TW, Roos D. Leukocyte extravasation: Mechanisms and consequences. *Behring Inst Mitt* 1993;92:107-37.
152. Sevilla J, Gonzalez Vincent M, Fernandez Plaza S i sur. Heparin based anticoagulation during peripheral blood stem cell collection may increase the CD34+ cell yield. *Haematologica* 2004;89:249-51.
153. Sadir R, Baleux F, Grosdidier A i sur. Characterization of the stromal cell derived factor 1 alfa heparin complex. *J Biol Chem* 2001;276:8288-96.
154. Sbaa-Ketata E, Courel MN, Delpech B, Vannier JP. Hyaluronan-derived oligosaccharides enhance SDF-1 dependent chemotactic effect on peripheral blood hematopoietic CD34+ cells. *Stem Cells* 2002;20:585-7.
155. Yong KL, Watts M, Shaun Thomas N i sur. Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECM-1 (CD31). *Blood* 1998;91:1196-205.

156. Watt SM, Williamson J, Genevier H i sur. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 1993;82:2649-63.
157. Mehta J, Singhal S. Current status of autologous hematopoietic stem cell transplantation in myeloma patients. *Bone Marrow Transplant* 2008;42 Suppl 1:S28-S34.
158. Kumar A, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: systematic review and metaanalysis. *J Natl Cancer Inst* 2009;21:100-6.
159. Nemet D, Sertić D, Mrić M i sur. Stem cell transplantation for multiple myeloma in Croatia: evaluation of the efficacy of double autologous stem cell transplantation. *Leukemia Res* 2007;31:S20-S21.
160. Gazitt Y, Reading C, Hoffman R i sur. Purified CD34+Lin-Thy+ stem cells do not contain clonal myeloma cells. *Blood* 1995;86:381-9.
161. Desikan KR, Jagannath S, Siegel D i sur. Collection of more hematopoietic progenitor cells with large volume leukapheresis in patients with multiple myeloma. *Leukemia Lymphoma* 1997;28:501-8.
162. Abrahamsen JF, Stamnesfet S, Liseth K i sur. Large-volume leukapheresis yields more viable CD34+ cells and colony-forming units than normal-volume leukapheresis, especially in patients who mobilize low numbers of CD34+ cells. *Transfusion* 2005;45:248-53.
163. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E i sur. Progenitor cell mobilization after low dose cyclophosphamide and G-CSF: an analysis of progenitor cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma *J Clin Oncol* 1997;15:535-46.
164. Haas R, Mohle R, Murea S i sur. Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by cytotoxic chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1994;3:323-30.

165. Bolan CD, Cecco SA, Wesley RA i sur. Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. *Transfusion* 2002;42:935-46.
166. Estivals M, Pelzer H, Sie P i sur. Prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin III complexes and D-dimers in acute deep vein thrombosis: effects of heparin treatment. *Br J Haematol* 1991;78:421-4.
167. Schreiner T, Wiesneth M, Krug E i sur. Collection of allogeneic peripheral blood progenitor cells by two protocols on an apheresis system. *Transfusion* 1998;38:1051-5.
168. Sarkodee-Adoo C, Taran I, Guo C i sur. Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34+ cell collection by large-volume apheresis. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:851-5.

## 10. ŽIVOTOPIS

Ines Bojanić

### Datum i mjesto rođenja

27. 7. 1964. Karlovac.

### Obrazovanje

1978.-1982. -Klasična gimnazija u Zagrebu

1982.-1988. -Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

1990. -završila poslijediplomski studij Onkologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1992. -završila poslijediplomski studij Zaštita majke i djeteta na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1993.-1996. -specijalizacija iz Transfuzijske medicine

### Zaposlenja

1988.-1989. -pripravnički staž u Domu zdravlja Trešnjevka

1990.-1991. -liječnik opće medicine u Domu zdravlja Trešnjevka

1993.-1996. -specijalizantski staž u Zavodu za kliničku transfuziologiju KBC Zagreb

1996. -specijalist transfuzijske medicine u Zavodu za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

2001. -voditelj Laboratorija za citaferezu u Zavodu za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

### Akademski stupnjevi

1991. -Magistar znanosti; Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet  
magistarski rad "Dugorajno liječenje prolaktinoma bromokriptinom"

### Nastavno zvanje

2002. -izbor u nastavno zvanje predavača, Visoka zdravstvena škola, kolegij Hematologija i transfuziologija

### Stručno usavršavanje

-više domaćih i međunarodnih tečajeva i kongresa, te međunarodnih škola iz područja transfuzijske medicine i hematologije

2001. na području transplantacije krvotvornih matičnih stanica: University College London Hospitals, UK; voditelj: prof. MJ Watts

2001. na području afereze: Allgemeine Krankenhaus die Stat Wien, Austrija; voditelj: prof. dr. P Hocker

2003. završen tečaj za neovisne ocjenjivače / vodeće neovisne ocjenjivače sustava upravljanja kvalitetom prema normi ISO 9001:2000 pri Lloyd's Register Quality Assurance

### **Znanstvena i stručna aktivnost**

-upisana u Popis znanstvenika i istraživača Ministarstva znanosti i tehnologije pod MB 243671 u znanstvenom području biomedicine i zdravstva

-istraživač na projektu Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica br. 108 133 Ministarstva znanosti RH

-autor 7 poglavlja u knjigama

-autor jednog rada objavljenog u časopisu koji se indeksira u CC, autor dva rada u časopisima koji se indeksiraju u SCI te autor i koautor devet radova u časopisima koji se indeksiraju u ostalim međunarodnim sekundarnim publikacijama (Medline, EMBASE)

-autor ili koautor 98 kongresnih priopćenja

### **Članstvo u profesionalnim udrugama**

1996. Hrvatsko društvo za hematologiju i transfuzijsku medicinu

1999. Hrvatska liječnička komora, član

1999. Nacionalna grupa za hemoblastoze i nasljedne koagulopatije, član  
Odbora za transfuzijsko liječenje hematoloških bolesnika

2008. International Society for Apheresis, član

### **Područje užeg stručnog i znanstvenog interesa**

Transplantacijska medicina

Banke tkiva

Osiguranje kvalitete u zdravstvenom sustavu

### **Obitelj**

Udana sam i majka dvoje djece

## 11. PRIVITAK

Tablica 19. Rezultati testiranja podataka na normalnost distribucije Kolmogorov-Smirnovljevim testom

<b>O b i l j e ž j a</b>	<b>z</b>	<b>p</b>
<b>Obilježja bolesnika</b>		
Dob (god)	0,840	0,480
Težina (kg)	0,742	0,640
Ukupan volumen krvi bolesnika (mL)	0,703	0,707
<b>Obilježja postupka leukaferoze</b>		
Obraden volumen krvi (mL)	0,766	0,601
Volumen antikoagulantne otopine (mL)	0,806	0,535
Ulazni protok krvi (mL/min)	0,479	0,976
Trajanje leukaferoze (min)	1,160	0,135
Volumen produkta (mL)	0,526	0,945
<b>Pokazatelji u perifernoj krvi</b>		
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L prije leukaferoze	0,544	0,929
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 1x obraden volumen krvi	0,625	0,829
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 2x obraden volumen krvi	0,747	0,631
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 3x obraden volumen krvi	0,777	0,583
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 4x obraden volumen krvi	0,766	0,600
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 5x obraden volumen krvi	0,823	0,508
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 6x obraden volumen krvi	0,903	0,389
MNC (%) prije leukaferoze	0,884	0,416
MNC (%) 1x obraden volumen krvi	0,731	0,660
MNC (%) 2x obraden volumen krvi	0,820	0,511
MNC (%) 3x obraden volumen krvi	0,957	0,319
MNC (%) 4x obraden volumen krvi	0,986	0,286
MNC (%) 5x obraden volumen krvi	1,032	0,237
MNC (%) 6x obraden volumen krvi	1,133	0,154
MNC x10 <sup>9</sup> /L prije leukaferoze	0,850	0,465
MNC x10 <sup>9</sup> /L 1x obraden volumen krvi	0,810	0,528
MNC x10 <sup>9</sup> /L 2x obraden volumen krvi	0,585	0,883
MNC x10 <sup>9</sup> /L 3x obraden volumen krvi	0,555	0,918
MNC x10 <sup>9</sup> /L 4x obraden volumen krvi	0,405	0,997
MNC x10 <sup>9</sup> /L 5x obraden volumen krvi	0,554	0,918
MNC x10 <sup>9</sup> /L 6x obraden volumen krvi	0,601	0,863
CD34+ (%) prije leukaferoze	1,124	0,160
CD34+ (%) 1x obraden volumen krvi	1,264	0,082
CD34+ (%) 2x obraden volumen krvi	1,132	0,154
CD34+ (%) 3x obraden volumen krvi	1,150	0,142
CD34+ (%) 4x obraden volumen krvi	1,232	0,096
CD34+ (%) 5x obraden volumen krvi	1,185	0,121
CD34+ (%) 6x obraden volumen krvi	1,133	0,154
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L prije leukaferoze	1,050	0,220
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 1x obraden volumen krvi	0,770	0,593
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 2x obraden volumen krvi	0,950	0,328
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 3x obraden volumen krvi	1,130	0,155
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 4x obraden volumen krvi	1,117	0,165
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 5x obraden volumen krvi	1,038	0,232
CD34+ x10 <sup>6</sup> /L 6x obraden volumen krvi	0,903	0,389

<b>Obilježja</b>	<b>z</b>	<b>p</b>
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L prije leukaferenze	0,713	0,690
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 1x obrađen volumen krvi	0,898	0,396
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 2x obrađen volumen krvi	0,735	0,653
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 3x obrađen volumen krvi	0,534	0,938
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 4x obrađen volumen krvi	0,782	0,573
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 5x obrađen volumen krvi	0,684	0,738
Trombociti x10 <sup>9</sup> /L 6x obrađen volumen krvi	0,678	0,748
Htc (%) prije leukaferenze	0,492	0,969
Htc (%) 1x obrađen volumen krvi	0,629	0,824
Htc (%) 2x obrađen volumen krvi	0,583	0,886
Htc (%) 3x obrađen volumen krvi	0,575	0,896
Htc (%) 4x obrađen volumen krvi	0,482	0,974
Htc (%) 5x obrađen volumen krvi	0,617	0,841
Htc (%) 6x obrađen volumen krvi	0,566	0,905
<b>Obilježja produkta</b>		
Volumen produkta (mL)	1,098	0,179
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 1. vrećica	0,572	0,898
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 2. vrećica	0,931	0,351
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 3. vrećica	0,761	0,609
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 4. vrećica	0,743	0,640
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 5. vrećica	0,609	0,852
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L 6. vrećica	0,646	0,799
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 1. vrećica	0,606	0,856
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 2. vrećica	0,764	0,603
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 3. vrećica	0,618	0,840
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 4. vrećica	0,980	0,292
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 5. vrećica	0,706	0,701
Leukociti x10 <sup>8</sup> /kgTT 6. vrećica	0,421	0,994
MNC (%) 1. vrećica	0,505	0,961
MNC (%) 2. vrećica	0,481	0,975
MNC (%) 3. vrećica	0,565	0,907
MNC (%) 4. vrećica	0,754	0,620
MNC (%) 5. vrećica	0,523	0,947
MNC (%) 6. vrećica	0,873	0,431
MNC x10 <sup>9</sup> /L 1. vrećica	1,051	0,219
MNC x10 <sup>9</sup> /L 2. vrećica	0,725	0,669
MNC x10 <sup>9</sup> /L 3. vrećica	0,995	0,276
MNC x10 <sup>9</sup> /L 4. vrećica	0,771	0,592
MNC x10 <sup>9</sup> /L 5. vrećica	0,746	0,633
MNC x10 <sup>9</sup> /L 6. vrećica	0,844	0,475
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 1. vrećica	0,535	0,937
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 2. vrećica	0,746	0,633
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 3. vrećica	0,574	0,897
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 4. vrećica	0,865	0,443
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 5. vrećica	0,598	0,867
MNC x10 <sup>8</sup> /kgTT 6. vrećica	0,592	0,875

<b>Obilježja</b>	<b>z</b>	<b>p</b>
CD34+ (%) 1. vrećica	1,278	0,076
CD34+ (%) 2. vrećica	1,279	0,076
CD34+ (%) 3. vrećica	1,059	0,212
CD34+ (%) 4. vrećica	0,995	0,275
CD34+ (%) 5. vrećica	0,918	0,369
CD34+ (%) 6. vrećica	0,929	0,354
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 1. vrećica	1,238	0,093
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 2. vrećica	1,221	0,101
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 3. vrećica	1,321	0,065
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 4. vrećica	1,273	0,078
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 5. vrećica	1,048	0,222
CD34+ x10 <sup>9</sup> /L 6. vrećica	1,091	0,185
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 1. vrećica	1,160	0,136
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 2. vrećica	0,969	0,305
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 3. vrećica	1,185	0,121
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 4. vrećica	1,162	0,134
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 5. vrećica	1,298	0,069
CD34+ x10 <sup>8</sup> /kgTT 6. vrećica	1,301	0,068
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica (ukupno)	0,705	0,703
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 1. vrećica	0,571	0,900
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 2. vrećica	0,504	0,962
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 3. vrećica	0,602	0,862
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 4. vrećica	1,119	0,164
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 5. vrećica	0,727	0,665
Učinkovitost sakupljanja CD34+ stanica 6. vrećica	0,629	0,823
<b>Faktor novačenja</b>		
Faktor novačenja leukocita	0,637	0,812
Faktor novačenja mononuklearnih stanica	0,583	0,885
Faktor novačenja CD34+ stanica	0,993	0,277
Faktor novačenja granulocita	0,561	0,912
Faktro novačenja trombocita	0,458	0,956
<b>Subpopulacije CD 34+ stanica</b>		
CD38+(%)	0,731	0,660
CD34+CD38+(%)	0,650	0,793
CD34+CD38+ x10 <sup>8</sup> /L	0,755	0,619
HLA-DR+(%)	0,655	0,785
CD34+HLA-DR+(%)	1,160	0,135
CD34+HLA-DR+x10 <sup>8</sup> /L	1,067	0,205
CD90+(%)	1,014	0,255
CD34+CD90+(%)	0,897	0,397
CD34+CD90+ x10 <sup>8</sup> /L	0,654	0,786
CD117+(%)	1,005	0,174
CD34+CD117+(%)	1,138	0,150
CD34+CD117+ x10 <sup>8</sup> /L	1,195	0,115
CD41+(%)	0,918	0,368
CD34+CD41+(%)	0,980	0,293
CD34+CD41+ x10 <sup>8</sup> /L	1,002	0,267
CD33+(%)	1,164	0,133
CD34+CD33+(%)	0,955	0,321



<b>O bilje žja</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
CD34+CD33+ x10 <sup>8</sup> /L	0,913	0,376
<b>Kratkotrajni uzgoj stanica</b>		
CFU-GM	0,434	0,992
BFU	0,415	0,995
CFU-MIX	0,621	0,836
<b>Koagulacijski pokazatelji</b>		
PV	0,738	0,648
APTV	0,668	0,763
<b>Elektroliti</b>		
Kalcij (mmol/L)	1,093	0,183
Kalij (mmol/L)	0,668	0,763
Magnezij (mmol/L)	0,985	0,286
Anorganski fosfati (mmol/L)	0,864	0,444
Natrij (mmol/L)	0,548	0,925
Kloridi (mmol/L)	0,714	0,688
<b>Hematološki oporavak</b>		
Leukociti >1x10 <sup>9</sup> /L (dan)	0,457	0,985
Granulociti >0,5x10 <sup>9</sup> /L (dan)	0,537	0,935
Trombociti >20x10 <sup>9</sup> /L (dan)	0,415	0,995
Trombociti >50x10 <sup>9</sup> /L (dan)	0,472	0,979

## 12. POPIS KRATICA

<b>ACD-A</b>	sterilna otopina limunske kiseline, natrijevog citrata i dekstroze <i>(engl. Acid Citrate Dextrose Formula-A)</i>
<b>BFU-E</b>	jedinica koja stvara eritroidne kolonije <i>(engl. burst forming unit-erythroid)</i>
<b>CFU-GM</b>	jedinica koja stvara granulocitno monocitne kolonije <i>(engl. colony forming unit-granulocyte-monocyte)</i>
<b>CFU-Mix</b>	jedinica koja stvara mješovite granulocitno eritroidne kolonije <i>(engl. colony forming unit-mixed)</i>
<b>EBMT</b>	European Blood and Marrow Transplantation Group
<b>G-CSF</b>	činitelj koji stimulira granulocitne kolonije <i>(engl. granulocyte colony stimulating factor)</i>
<b>GM-CSF</b>	činitelj stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija <i>(engl. granulocyte macrophage colony stimulating factor)</i>
<b>IL</b>	interleukin
<b>KMS</b>	krvotvorna matična stanica
<b>LVV</b>	leukaferenza velikog volumena krvi
<b>MNC</b>	mononuklearna stanica <i>(engl. mononuclear cell)</i>
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze <i>(engl. polymerase chain reaction)</i>
<b>PTH</b>	paratirodni hormon
<b>TNC</b>	stanica s jezgrom <i>(engl. total nucleated cell)</i>
<b>VCAM-1</b>	vaskularna adhezijska molekula <i>(engl. vascular cell adhesion molecule-1)</i>