

# SEED Hematologia



## Transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych – część 2

W pierwszej części publikacji SEED wyjaśniono szczegóły dotyczące komórek macierzystych oraz immunologii przeszczepu. Druga część skupia się na procesie przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT), który jest złożony i obejmuje podejście multidyscyplinarne. Przebieg transplantacji można podzielić na etapy: przygotowanie dawcy (mobilizacja), afereza (pobranie komórek), preparatyka materiału, przeszczep i monitorowanie biorcy. Przebieg allogenicznego i autologicznego przeszczepu komórek macierzystych przedstawiono na ryc. 1.

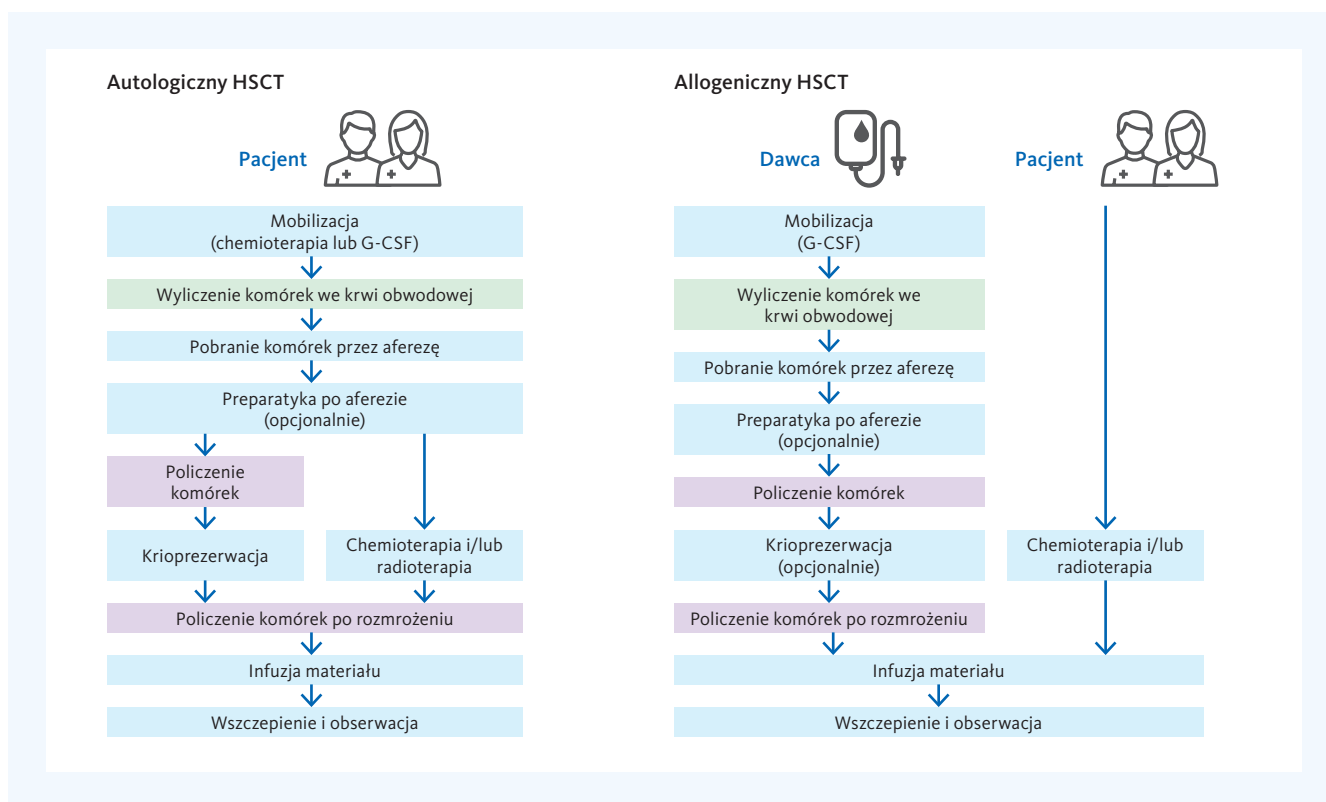
### Mobilizacja komórek macierzystych

Komórki macierzyste są obecne we krwi obwodowej w niewielkiej ilości. Aby pobrać wystarczającą liczbę do przeszczepu, należy pobudzić ich przeniesienie ze szpiku kostnego do krwi pacjenta. Efekt ten można uzyskać poprzez podanie rekombinowanych ludzkich krwiotwórczych czynników wzrostu, takich jak czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), przez okres kilku dni. G-CSF stymuluje podział krwiotwórczych komórek macierzystych w szpiku. Dodatkowo, poprzez złożoną kaskadę ekspresji genów i białek, G-CSF prowadzi do zmniejszonej adhezji między komórkami macierzystymi a ich mikrośrodowiskiem w szpiku kostnym. W rezultacie komórki macierzyste opuszczają szpik i dostają się do krwiobiegu, a ich stężenie we krwi wzrasta

10–100 krotnie. Pobranie tych zmobilizowanych komórek macierzystych rozpoczyna się zwykle w czwartym lub piątym dniu od podania G-CSF.

W przypadku przeszczepów autologicznych pacjenci poddawani są dodatkowej chemioterapii przed podaniem G-CSF i pobraniem komórek macierzystych. Chemioterapia uszkadza komórki szpiku kostnego, co również prowadzi do mobilizacji komórek macierzystych do krwiobiegu. Z tego względu chemioterapia oraz podanie G-CSF prowadzone są synergicznie. Jeśli jednak chemioterapia była zbyt ostra i wyniszczająca, mobilizacja komórek macierzystych u pacjenta może być słaba i niewystarczająca w kontekście rozpoczęcia pobierania.

Liczba komórek macierzystych we krwi jest oznaczana we wszystkich przypadkach przeszczepów, autologicznych oraz, w większości krajów, także przeszczepów allogenicznych. Pomaga to w określeniu najlepszego momentu rozpoczęcia pobierania komórek macierzystych. Optymalne stężenie komórek macierzystych kwalifikujące do przeszczepienia to  $5-10 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała dawcy, a minimalne stężenie to  $2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała. Ustalone zakresy mogą się różnić w zależności od kraju i ośrodka przeprowadzającego procedurę transplantacji, ale zazwyczaj wahają się od 5 do 20 komórek CD34+/ $\mu$ l.



Ryc. 1 Proces autologicznego i allogenicznego przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych

## Procedura aferezy

Mobilizowane komórki macierzyste są pobierane z krwi obwodowej w procesie aferezy, do którego wykorzystuje się urządzenie zwane „separatorom krwi”.  
„separatorom krwi”.

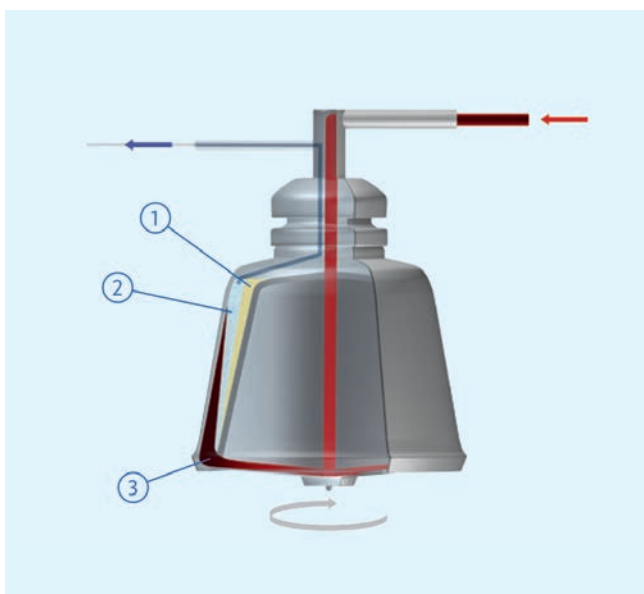
Na obu przedramionach zakładane są dożylne z użyciem dużych igieł lub cewników (patrz ryc. 2).

Krew pobierana z jednej ręki jest mieszana z cytrynianowym roztworem antykoagulantu i pompowana do urządzenia. Separator krwi jest zasadniczo wirówką, w której składniki krwi są oddzielane siłami odśrodkowymi w zależności od ich gęstości. Czerwone krwinki – składnik o największej gęstości – przenoszone są na zewnątrz do ściany komory odśrodkowej. Białe krwinki tworzą kożuszek leukocytarny między warstwą czerwonych krwinek a osoczem, które znajduje się na górze. Płytki krwi pozostają w osoczu. Igła aspiracyjna w wirówce pobiera wyłącznie frakcję białych krwinek, ponieważ zawiera ona komórki jednojądrzaste i są tam obecne komórki macierzyste. Ta frakcja jest transportowana do sterylnego worka, gdzie będzie przechowywana aż do dalszego przetwarzania. Wszystkie inne składniki są ostatecznie przefiltrowywane i wracają do krwiobiegu dawcy poprzez wkłucie na drugim przedramieniu. Krew jest uzupełniana solą fizjologiczną i albuminami oraz przywraca się ją do temperatury organizmu pacjenta. Stosowany antykoagulant cytrynianowy jest nietoksyczny i ulega rozkładowi w wątrobie w ciągu kilku godzin (patrz ryc. 3).



Ryc. 2 Pacjent poddany zabiegowi aferezy

Zabieg aferezy jest bezbolesny, ale trwa kilka godzin, zwykle od czterech do pięciu. W niektórych przypadkach, gdy proces mobilizacji jest niezadowolający może być konieczne wykonanie kilku procedur aferezy w kolejnych dniach. Ma to na celu pobranie wystarczającej ilości komórek macierzystych. Alternatywną metodą w takim przypadku jest pobranie do separatora większej objętości krwi w porównaniu ze standardową procedurą aferezy. W związku z tym stosowane są terminy „SVL” (leukaferaza o standardowej objętości) i „LVL” (leukaferaza o dużej objętości). W LVL jest to



Ryc. 3 Przebieg aferezy. 1: Osocze, 2: WBC, 3: RBC

więcej niż 15 litrów krwi lub ponad 3-krotność objętości krwi przetwarzanej podczas jednej standardowej procedury. Można to osiągnąć wydłużając czas aferezy i kilkakrotnie przeprowadzając krew przez cały układ urządzenia.

Po pierwszej procedurze rozdziálu, gdy wymagana objętość krwi została przepompowana przez separator, stężenie komórek macierzystych w krwi obwodowej dawcy znacznie spada i zjawisko nasila się po każdej kolejnej rundzie aferezy. Z drugiej strony, komórki macierzyste są nadal mobilizowane ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, finalnie do 55% komórek w końcowym produkcie aferezy reprezentuje te mobilizowane w trakcie. Zarówno spadek stężenia komórek macierzystych, jak i efektywność ich mobilizacji mogą się znacznie różnić u poszczególnych pacjentów.

Po uzyskaniu wymaganej ilości komórek aferezą można zakończyć. Osiągnięcie minimalnego stężenia komórek CD34+ jest ważne, ponieważ ich odpowiednia ilość pozytywnie koreluje z wynikiem przeszczepu. W niektórych przypadkach afereza jest powtarzana w kolejnych dniach w celu uzyskania wystarczającej ilości komórek macierzystych.

## Oznaczenie ilości komórek macierzystych

Fenotypowanie komórek za pomocą cytometrii przepływowej jest standardową metodą oznaczania liczby komórek macierzystych. Zlicza się je z krwi obwodowej dawcy podczas fazy mobilizacji, aby ocenić, czy uzyskane stężenie jest wystarczające do rozpoczęcia aferezy.

Metody wyliczania komórek macierzystych można zdefiniować jako dwu- i jednoetapowe.

W metodzie dwuetapowej całkowita liczba białych krwinek jest określana początkowo za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego. Następnie niewielką część krwi (lub produktu aferezy) znakuje się przeciwciałami anti-CD45 i anti-CD34 sprzężonymi z fluorochromem i oznacza za pomocą cytometrii przepływowej. CD45 jest białkiem obecnym na powierzchni wszystkich białych krwinek, a CD34 jest markerem powierzchni komórek macierzystych. Stosując specjalny protokół bramkowania, można określić procent komórek CD34+ w stosunku do komórek CD45+. Znając bezwzględną liczbę białych krwinek na podstawie wyników analizatora hematologicznego, można obliczyć stężenie komórek macierzystych.

W metodzie jednoetapowej niewielka określona część krwi (lub produktu aferezy) jest znakowana przeciwciałem anti-CD34 sprzężonym z fluorochromem, a następnie dodawana do próbki zawierającej znaną ilość fluorescencyjnych mikrokulek. Stosunek komórek macierzystych CD34+ do mikrokulek określa się metodą cytometrii przepływowej, a stężenie komórek macierzystych oblicza się na podstawie znanego stężenia mikrokulek. Ta metoda wymaga dużej dokładności podczas pipetowania.

W kilku badaniach porównano metody oznaczania liczby komórek macierzystych i nie znaleziono żadnych istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami. Jednak International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) zaleca stosowanie metody jednoetapowej.

## Preparatyka po aferezie

Produkty aferezy mogą być poddawane specjalnemu przygotowaniu przed przeszczepem w celu poprawy skuteczności planowanej transplantacji. Zatem w przeszczepach allogenicznych limfocyty T wyeliminowane są przez przeciwciała, zmniejszając tym samym ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciw gospodarzowi GvHD. Jednym z zagrożeń związanych z autologicznym przeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych jest zanieczyszczenie materiału przeszczepowego komórkami nowotworowymi, co prowadzioby u pacjenta do ponownej ich infuzji i zwiększało ryzyko nawrotu choroby. W przypadku przeszczepu autologicznego u pacjentów z guzami CD34-ujemnymi stosuje się selekcję komórek CD34+. Pozwala to na usunięcie ewentualnych pozostałości komórek nowotworowych z przeszczepu. Podczas tej procedury przeciwciała anti-CD34 związane z kulkami magnetycznymi są zwracane do produktu aferezy, który następnie przechodzi przez kolumnę z aktywowanym polem magnetycznym. Wszystkie komórki CD34 przechodzą przez kolumnę, podczas gdy komórki CD34+ są zatrzymywane dzięki kulkom magnetycznym, które są związane z przeciwciałami anti-CD34. Kiedy siła magnetyczna w kolumnie jest dezaktywowana, komórki CD34+ można zebrać i odseparować. Metoda ta pozwala na otrzymanie wysoko wzbogaconego przeszczepu CD34+ o czystości komórek powyżej 95%.

## Przeszczep i monitorowanie biorcy

Ostatnią fazą HSCT jest podanie komórek do organizmu biorcy i monitorowanie reakcji organizmu w okresie poprzyszczepowym. W tym czasie infuzyjne komórki macierzyste trafiają do mikrośrodowiska szpiku kostnego i wypełniają brakującą tam niszę. Po przeszczepie pacjentowi podaje się cytokiny, aby przyspieszyć dojrzewanie komórek macierzystych i przywrócić pożądaną zawartość elementów morfotycznych krwi. Pierwszą oznaką wszczepienia jest powrót białych krwinek (WBC) do satysfakcjonującego poziomu, który jest zwykle definiowany jako bezwzględna liczba neutrofilii (ANC) > 500 komórek/ $\mu$ l przez 3 kolejne dni. Zwykle ma to miejsce w przedziale 7–14 dni po podaniu pacjentowi komórek macierzystych. Liczba PLT powyżej zakresu referencyjnego (brak wspomaganie transfuzji) jest kolejnym wskaźnikiem powrotu do zdrowia i występuje ok. 2–3 tygodnie po przeszczepie. Najnowsze badania sugerują również użycie niedojrzałej frakcji retikulocytów (IRF) i niedojrzałej frakcji płytek krwi (IPF) jako wskaźników przyjęcia komórek dawcy.

Do czasu wszczepienia pacjenci są narażeni na zwiększone ryzyko infekcji, dlatego należy przedsięwziąć środki ostrożności, aby uniknąć narażenia na drobnoustroje chorobotwórcze. Pacjenci często wymagają włączenia dodatkowych terapii, w tym leków przeciwwymiotnych, przeciwbólowych, antybiotyków i wspomaganie żywieniowego w celu złagodzenia skutków chemioterapii przygotowawczej i występującego przedłużonego okresu pancytopenii.

## Źródła

- [1] **Barnett D et al. (1999):** Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. *Clin Lab Haem* 21:301–308.
- [2] **Copelan E. (2006):** Haematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 354(17):1813–1826.
- [3] **Gratwohl A et al. (2010):** Hematopoietic stem cell transplantation: A global perspective. *J Amer Med Assoc*. 303(16):1617–1624.
- [4] **The European Group for Blood and Marrow Transplantation (2011):** Haematopoietic stem cell mobilisation and apheresis: A practical guide for nurses and other allied health care professionals.
- [5] **Hatzimichael E et al. (2010):** Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 3:105–117.
- [6] **Hester J. (2000):** Peripheral blood stem cell collection: The interaction of technology, procedure, and biological factors. *Transfus Sci*. 23:125–132.
- [7] **O'Meara A et al. (2014):** Forty years of haematopoietic stem cell transplantation: A review of the Basel experience. *Swiss Med Wkly*. 144:w13928.
- [8] **Takami A. (2010):** Approaches to hematopoietic stem cell transplantation. *Sysmex Corporation, Scientific Affairs*.
- [9] **Whitby A et al. (2012):** ISHAGE protocol: are we doing it correctly? *Cytometry Part B*. 82B:9–17.
- [10] **Gonçalo AP et al. (2011):** Predictive Value of Immature Reticulocyte and Platelet Fractions in Hematopoietic Recovery of Allograft Patients *Transplant Proc*. Vol 43:241.

Opracowane przez: Dr. Alexandra Maroz

## Przydatne linki

**www.ebmt.org**

The European Group for Blood and Marrow Transplantation

**www.cibmtr.org**

Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR)

**www.asbmt.org**

American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASMBT)