

Dr. Jaime Sanz Caballer, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

ÚVOD

Cílem transplantace krvetvorných kmenových buněk je úplné obnovení normální lymfo-hematopoézy u pacienta s poškozenou kostní dření, primární imunodeficiencí nebo s metabolickou chorobou po přípravné léčbě chemoterapií a/nebo radioterapií. Tento přípravný režim je jednak součástí léčby choroby u autologní transplantace, ale slouží také k podpoře přijetí nových krvetvorných kmenových buněk (HSC) u transplantace alogenní. S výjimkou některých nemyeloablativních příprav se kostní dřeň není schopná po přípravné léčbě sama obnovit a k obnově normální funkce je třeba infuze HSC. Toto obnovení částečně závisí na počtu a kvalitě krvetvorných progenitorů podaných v infuzi. Pokud se pomocí infuze HSC obnoví hematopoéza, lze říci, že bylo dosaženo úspěšné implantace štěpu.

HSC lze získat z různých zdrojů, včetně kostní dřeně, mobilizované periferní krve a pupečnickové krve (CB). Je obtížné říci, který zdroj těchto kmenových buněk by měl být přinejmenším u některých specifických chorob a dárcovských typů (nepříbuzný versus příbuzný dárce a dětský versus dospělý dárce) preferován. Dokonalý HLA identický sourozenecký dárce je dostupný obvykle pouze u 15-30% všech pacientů, kteří potřebují transplantaci. Pro zbývající pacienty je nutné hledat vhodného nepříbuzného dobrovolného dárce, který není vždy dostupný a jehož nalezení vyžaduje delší čas, což může ovlivnit konečný výsledek transplantace. Pro tyto případy nabízí alternativní zdroj kmenových buněk HLA nekompatibilní štěp ochuzený o T buňky od příbuzného nebo nepříbuzného dárce nebo nepříbuzenská, již kryoprezervovaná pupečnicková krev.

Během let se stala transplantace kmenových buněk, hlavně v alogenní formě, velmi složitou a obnovení normální funkce kostní dřeně není k zajištění úspěšné transplantace dostatečné. U alogenních transplantací v případě leukémií zůstává například hlavním cílem udržení reakce štěpu proti nádoru a současně zabránění vážné reakci štěpu proti hostiteli (GvHD). V některých případech proto může mít smysl deplece T buněk za účelem snížení rizika GvHD, zatímco u jiných pacientů se přistupuje k infuzi T buněk za účelem zvýšení reakce štěpu proti tumoru.

V této kapitole uvádíme základní přehled nejběžnějších zdrojů kmenových buněk,

způsobů jejich odběru a zpracování.

KRVETVORNÉ KMENOVÉ BUŇKY

Původně, z funkčního hlediska, se krvetvorné kmenové buňky definovaly jako buňky, které mají schopnost se obnovovat, a proto jsou schopné znovu nastolit normální dlouhotrvající funkci kostní dřeně u smrtelně ozářených myší. Tento funkční přístup bylo možno přenést na lidské pacienty po prokázání toho, že kmenové buňky jsou schopné obnovit špatnou lymfo-hematopoézu, např. u pacientů s primární imunodeficiencí nebo aplastickou anemií.

Po celou dobu bylo hlavním zájmem identifikovat a charakterizovat tyto buňky buď jejich ex-vivo kultivací nebo definováním specifických epitopů buněčných povrchů, které lze rozpoznat monoklonálními protilátkami a které jsou nejenom charakteristickými markery specifických buněčných linií, ale také stupňů zrání těchto buněk. Ačkoli konečný fenotyp nejméně zralých lidských HSC nebyl ještě zcela definován, ví se, že infuze vysoce purifikovaných CD34+ buněk je schopná rychle a trvale přihojit štěp a obnovit lymfohematopoetický systém. Proto se z praktických transplantačních důvodů předpokládá, že progenitorové buňky vykazující CD34+ povrchový antigen obsahují dostatečné populace odpovídajících kmenových buněk. Existují pravděpodobně další buněčné subpopulace, které jsou schopné fungovat jako kmenové buňky, např. buňky CD133+. Avšak tyto se při transplantaci nebo k charakterizaci množství kmenových buněk v transplantátu běžně nepoužívají.

KOSTNÍ DŘEŇ JAKO ZDROJ KMENOVÝCH BUNĚK

Kostní dřeň je běžným zdrojem odběru HSC již více než 40 let. Od roku 1990 došlo na celém světě k výraznému zvýšení používání kmenových buněk periferní krve (PBSC) u autologních i alogenních štěpů. V současné době se téměř všechny autologní transplantace u dětských i u dospělých pacientů provádějí z PBSC. U alogenních transplantací dosud existují otevřené otázky. Počet CD34+ buněk je sice u PBSC ve srovnání s kostní dření vyšší, což vede k rychlejšímu přihojení štěpu, ovšem vyšší počet T buněk zároveň způsobuje vyšší výskyt obzvláště chronické GVHD, což prokázaly různé studie. Ačkoli by mnoho dospělých dárců dalo přednost PBSC místo odběru kostní dřeně při celkové anestézii, je nutno zdůraznit, že u dětských rodinných dárců zůstává odběr kostní dřeně primární volbou. Odběr mobilizované PBSC navíc není v této věkové skupině v některých zemích dovolen, protože vyžaduje aplikaci

růstových faktorů.

Odběr kostní dřeně

Kostní dřeň (BM) se obvykle odebírá ze zadního výběžku kyčelní kosti dárce. Zákrok se obvykle provádí v celkové anestézii nebo méně často v lokální anestézii. Odběr začíná v zadním horním trnu kyčelní kosti. Běžný odběr vyžaduje asi 200 až 300 vpichů vedených přímo kůží nebo přes malý řez. Jakmile jehla projede povrchem kosti, nasaje se s použitím heparinované injekční stříkačky ne více než 5-10 ml kostní dřeně. Nasátý produkt se potom filtruje a převede do antikoagulačního roztoku, obvykle ACD v koncentraci 1:10 objemových množství ACD : BM a/nebo 10 IU heparinu na ml BM. Odebraná kostní dřeň je vždy kontaminována normální krví. Stupeň kontaminace souvisí s celkovým objemem odebrané kostní dřeně, ale také zcela jasně závisí na způsobu odběru a je nižší po intenzivních krátkých odsátích. Požadovaná dávka buněk, která se za čtyři desetiletí empiricky ustálila, závisí na množství jaderných buněk kostní dřeně, které by mělo být aspoň 1 - 2 x 10⁸/kg pro autologní transplantace a alespoň 2 x 10⁸/kg, lépe 4-6 x 10⁸/kg pro alogenní transplantace.

Přední výběžek kyčelní kosti je možno použít, je-li to nutné, ale množství, které lze odebrat, je jasně nižší než při využití zadního výběžku kyčelní kosti.

Negativní dopady související s odběrem kostní dřeně

Odběr kostní dřeně je bezpečný. Obvykle se s ním pojí spíše mírné a přechodné vedlejší účinky. Velká většina dárců pocítila bolest v oblasti vpichu nebo pouze v zádech. Mírné negativní dopady mohou zahrnovat zvýšenou teplotu, nevolnost, zvracení nebo mírnou bolest hlavy.

Závažné negativní dopady darování kostní dřeně jsou řídké, s frekvencí 0,1%-0,3%. Lze je rozdělit do pěti rizikových kategorií, které zahrnují anestézii, infekci, mechanické poranění, transfuzi a jiné. Alogenní krevní transfuze se především u dospělých dárců běžně nepoužívá, protože ztráta krve obvykle tuto praxi nevyžaduje. Doporučuje se, aby celkový objem odebrané kostní dřeně nepřevýšil 15-20 ml/kg tělesné váhy příjemce. Některá centra odeberou před vlastní procedurou autologní krev, která se podá znovu transfuzí během nebo po odběru kostní dřeně.

KMENOVÉ BUŇKY PERIFERNÍ KRVE JAKO ZDROJ KMENOVÝCH BUNĚK

Kmenové buňky periferní krve (PBSC) se nyní používají jako zdroj kmenových buněk pro HSCT ve zvýšené míře. Za běžných podmínek je však objem CD34+ buněk v periferní krvi k dostačujícímu odběru příliš nízký. Z tohoto důvodu je ke zvýšení počtu CD34+ buněk obíhajících v krvi nutná jejich mobilizace s pomocí růstových faktorů.

Mobilizace PBSC/strong>

Nejběžnějším způsobem mobilizace oběhu kmenových buněk do periferní krve je použití růstových faktorů, zejména G-CSF. K dobré mobilizaci PBSC obvykle postačuje dávka 10 až 16 mcg/kg denně po dobu čtyř po sobě jdoucích dní s následnou aferézou od pátého dne. Ve většině případů je u autologní nebo alogenní transplantace dostačující jeden odběr. Zřídka je šestého dne nutné darování dalších buněk, zejména tehdy, kdy se u transplantátů po depleci T buněk mezi neshodnými dárci vyžadují vysoké dávky kmenových buněk. Sporadické jsou také případy nízkého mobilizačního potenciálu (tzv. „poor mobilizers“), kdy po nevydařeném odběru PBSC následuje odběr kostní dřeně. Z tohoto důvodu byla zjištěna řada alternativních růstových faktorů, jako je např. faktor kmenových buněk. V posledních letech se kromě G-CSF jako účinný chemokin pro pacienty s nízkým mobilizačním potenciálem používá plerixafor. Kmenové buňky mají CXCR4 receptory, které zabraňují jejich uvolnění do obíhající krve interakcí s odpovídajícím chemikinem. Plerixafor má silnou a reverzibilní vazbu na tyto receptory, blokuje vazbu mezi kmenovou buňkou a „niche“ kostní dřeně, a tak uvolňuje kmenové buňky do obíhající krve. Náhodné klinické testy prokázaly, že kombinace plerixaforu a G-CSF mají skutečně lepší výsledky než G-CSF samotný. Další alternativou pro mobilizaci kmenových buněk je chemoterapie v autologním prostředí. Po obnovení kostní dřeně po standardní dávce chemoterapie byl pozorován výrazný nárůst kmenových buněk v periferní krvi, zejména tehdy, byl-li následně podán G-CSF. Nejběžnějším mobilizačním postupem je tedy kombinace cyklofosfamidu a G-CSF. Někdy je chemoterapie využívána k léčbě základní choroby zároveň prostředkem k odběru PBSC, i když v některých případech je hematologická obnova velmi pomalá a dostatečný odběr PBSC nemožný.

Odběr PBSC

Po mobilizaci je třeba odebrat cirkulující PBSC za pomoci aferézní techniky. Existují různé přístroje, které dosahují co do odběru CD34+ buněk podobné výsledky. Nejvýznamnější rozdíly jsou v počtu destiček nebo červených krvinek ve finálním produktu.

Aby bylo možno odhadnout dostatečný odběr PBSC, počet CD34+ buněk by měl v den odběru po mobilizaci dosahovat nejméně 10 buněk/microL. Některá centra k odběru nepřistoupí, pokud tohoto minimálního počtu obíhajících CD34+ buněk není dosaženo. Je však nutno uvědomit si, že měření CD34+ buněk v periferní krvi, zejména v případě jejich nízkých hladin, mohou být velmi nepřesná.

Nepříznivé účinky odběru PBSC

Podobně jako dárce kostní dřeně, i dárce PBSC mohou trpět mírnými nepříznivými účinky. Závažné, životu nebezpečné vedlejší účinky nejsou časté.

Nejběžnějším vedlejším účinkem je bolest v kostech spojená s léčbou G-CSF. Vyskytuje se u 85% dárců. Nejvíce patrná bývá v pánvi, kyčlích, páteři a žebrech. Další mírné vedlejší účinky zahrnují nevolnost, zvracení, myalgii, únavu nebo nespavost. Objevují se také změny v chemickém rozboru krve a krevním obrazu (např. zvýšení LDH a transamináz, snížení počtu destiček). Obvyklé vedlejší účinky dále zahrnují hypokalcémii, pokud se jako antikoagulans použije citrát. Nutný je řádný žilní přístup. U většiny zdravých dárců se PBSC odebírají prostřednictvím periferního žilního přístupu, někdy je však vyžadován centrální přístup s vyšší mírou nepříznivých účinků. Stejně jako u odběru kostní dřeně jsou závažné vedlejší účinky po darování PBSC méně vzácné, s frekvencí okolo 0,1%, a většinou jsou spojeny s léčbou cytokiny, centrálním přístupem nebo kardiovaskulárním stresem. Pozorovány byly také autoimunitní choroby, natržení sleziny a jiné vedlejší účinky. Sledován byl výskyt leukémie po podání G-CSF. Veškerá důsledná pozorování u celé řady dárců PBSC naznačují, že toto riziko není vyšší než u běžné populace stejného věku.

MANIPULACE S KMENOVÝMI BUŇKAMI

Kryoprezervace krvetvorných kmenových buněk

Pokud jsou krvetvorné kmenové buňky (HSC) z kostní dřeně nebo periferní krve podány infuzí do 48, respektive 72 hodin od odběru, není kryoprezervace štěpu nutná. Buňky lze uložit při pokojové teplotě nebo na delší dobu při teplotě 4°C, v souladu s postupy daného centra (standardní operační postupy/SOP).

Při dlouhodobém uskladnění by měly být HSC kryoprezervovány v souladu s SOP v kryoprezervačním roztoku (obvykle 10% DMSO v autologní plazmě, HES nebo v albuminu). Po řízeném zmrazení mohou být buňky uloženy v tekutém dusíku na dobu nejméně 10 let.

Deplece T buněk

Manipulace se štěpy lze obecně rozdělit na postupy spojené s odstraňováním lymfocytů, zejména z důvodu prevence GvHD u alogenních transplantací, pozitivní selekcí kmenových buněk ze stejného důvodu, a s odstraňováním nádorových buněk u autologních transplantací. V případě alogenních transplantací je ex-vivo deplece T buněk u transplantátů indikována z větší míry při použití neshodných dárců. Provádí se proto, aby se zabránilo smrtelné GvHD. Při použití HLA méně shodných nepřibuzných dárců se provádí proto, aby se snížil výskyt a závažnost reakce štěpu proti hostiteli. Úspěch tohoto procesu závisí na separačním postupu, celkovém počtu podaných CD34+ buněk a počtu a složení zbývajících lymfocytů. U aloštěpů je cílem omezit reakci štěpu proti hostiteli, aniž by se podstatně zvýšilo riziko selhání štěpu. Snížení počtu T buněk na méně než $1 \times 10^4/\text{kg}$ tělesné hmotnosti příjemce dokáže zabránit závažné GvHD i při použití transplantátů s neshodným HLA-haplotypem. Na druhé straně u příbuzných nebo nepřibuzných transplantátů se shodným HLA-haplotypem by mělo být k odvrácení selhání štěpu dosaženo minimální dávky CD34+ buněk $2 \times 10^6/\text{kg}$.

Dnes je nejběžnější metodou používanou k ex-vivo depleci lymfocytů nebo selekcí CD34+ pozitivních buněk imunomagnetická separace. Tato metoda využívá monoklonální protilátky namířené proti specifickým lymfocytům nebo epitopům kmenových buněk, které jsou magneticky označeny. Umožňuje produkci transplantátů s vysokým počtem velmi čistých CD34+ buněk nebo jiných štěpů kmenových buněk kombinovaných s

daným nízkým nebo velmi nízkým počtem T buněk, T a B buněk nebo podskupin lymfocytů.

Je však nutno poukázat na to, že ztráta kritického počtu T buněk nebo podskupin v transplantátu s sebou nese riziko opožděné imunitní rekonstituce a ztráty reakce štěpu proti nádoru.

BUŇKY PUPEČNÍKOVÉ KRVE

Kmenové buňky pupečnickové krve jsou dalším alternativním zdrojem kmenových buněk pro alogenní transplantace od nepříbuzných dárců nebo ve vzácných případech u sourozenců už od roku 1988. Zřejmou výhodou je vysoká koncentrace nezralých kmenových buněk, okamžitá dostupnost již charakterizovaných a kryoprezervovaných produktů a nízká míra rizika výskytu akutní GvHD u příjemců transplantátu, i když existuje více rozdílů v HLA než u dospělých dobrovolných dárců. Má to však i své nevýhody, jako je dlouhá hematologická a imunitní rekonstituce. Proto se výsledky transplantací CB co se týče rizika infekce a recidivy a výskytu a chronické GvHD často blíží výsledkům transplantací T buněk po depleci a transplantací s použitím haploidentických dárců.

Dalším závažným problémem je nízká celková dávka kmenových buněk v jedné jednotce pupečnickové krve, což umožňuje použití tohoto zdroje kmenových buněk u kojenců a malých dětí, ale vyžaduje další opatření kombinující více než jednu jednotku CB u starších (hmotnějších) dětí či dospělých pacientů.

Pupečnickovou krev je možno odebírat po porodu placenty buď „in utero“ nebo „ex utero“, přičemž metoda „ex utero“ se preferuje, je technicky snazší a bezpečnější. I když by měla být vyvinuta snaha k tomu, aby bylo z pupeční žíly odebráno co nejvíce pupečnickové krve, je třeba mít na paměti, že odběr pupečnickové krve nesmí nikdy ohrozit bezpečnost matky a dítěte při porodu.

V případě odběru „in utero“ se před porodem připraví sada pro odběr pupečnickové krve. Po porodu dítěte a před porodem placenty se pupečnicková šňůra podváže a

ustříhne jako v jiných případech. Potom se s pomocí zvláštní jehly a ve sterilních podmínkách krev převede působením gravitace do sáčku s antikoagulačním roztokem. Odběr „ex utero“ se provádí podobným způsobem po porodu placenty ve zvláštní místnosti. V ideálním případě by měl být odebrán střední objem pupečnickové krve o zhruba 120 ml, ne však méně než 40 ml.

Po odběru se pupečnicková krev odešle do laboratoře, kde je testována, zpracována a uskladněna v tekutém dusíku po dobu 48 hodin od odběru. Většina laboratoří raději odstraní většinu plazmy a červených krvinek, aby mohla jednotku CB uskladnit v menším objemu, což umožňuje nižší obsah DMSO a následné použití bez jeho vymývání po rozmrazení.

Je-li pro dětského pacienta vybrána jediná jednotka pupečnickové krve, měla by shoda v antigenech HLA dosahovat nejméně 4/6, včetně HLA-A, -B, a DRB1, počet jaderných buněk v době odběru by měl být vyšší než $3,7 \times 10^7/\text{kg}$ a počet CD34+ kmenových buněk vyšší než $1,7 \times 10^5/\text{kg}$ tělesné hmotnosti příjemce.

Odkazy na použitou literaturu:

1. Brauninger S, Bialleck H, Thorausch K, Felt T, Seifried E, Bonig H. Allogeneic donor peripheral blood "stem cell" apheresis: prospective comparison of two apheresis systems. *Transfusion* 2012; 52(5):1137-45
2. Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2011; 154(4):441-7.
3. Al-Ali HK, Bourgeois M, Krahl R, Edel E, Leiblein S, Poenisch W, Basara N, Lange T, Niederwieser D. The impact of the age of HLA-identical siblings on mobilization and collection of PBSCs for allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46(10):1296-302
4. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szer J, Lipton J, Schwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D,

- Horowitz M, Kodera Y; Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. JAMA 2010; 303(16):1617-24**
- 5. Anguita-Compagnon AT, Dibarrart MT, Palma J, Paredes L, Mosso C, Montalva R, Salas L, Araos D, Delgado I, Majlis A. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells: guidelines for blood volume to process, based on CD34-positive blood cell count in adults and children. Transplant Proc 2010; 42(1):339-44**
- 6. Hölig K, Kramer M, Kroschinsky F, Bornhäuser M, Mengling T, Schmidt AH, Rutt C, Ehninger G. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. Blood 2009; 114(18):3757-63.**
- 7. Shaz BH, Demmons DG, Hillyer CD. Critical evaluation of informed consent forms for adult and minor aged whole blood donation used by United States blood centers. Transfusion 2009; 49(6):1136-45**
- 8. Siddiq S, Pamphilon D, Brunskill S, Doree C, Hyde C, Stanworth S. Bone marrow harvest versus peripheral stem cell collection for haemopoietic stem cell donation in healthy donors. Cochrane Database Syst Rev 2009; 21(1):CD006406. Review**
- 9. Kao RH, Li CC, Shaw CK, Wang TF, Chu SC, Chen SH, Yao CY, Huang KP, Wu YF. Correlation between characteristics of unrelated bone marrow donor and cell density of total nucleated cell in bone marrow harvest. Int J Hematol 2009; 89(2):227-30.**
- 10. Sevilla J, González-Vicent M, Lassaletta A, Ramírez M, Pérez-Martínez A, Madero L, Díaz MA. Peripheral blood progenitor cell collection adverse events for childhood allogeneic donors: variables related to the collection and safety profile. Br J Haematol 2009; 144(6):909-16.**
- 11. Styczynski J, Balduzzi A, Gil L, Labopin M, Hamladji RM, Markt S, Yesilipek MA, Fagioli F, Ehlert K, Matulova M, et al.; on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Pediatric Diseases Working Party. Risk of complications during hematopoietic stem cell collection in pediatric sibling donors: a prospective European Group for Blood and Marrow Transplantation Pediatric Diseases Working Party study. Blood 2012; 119(12):2935-42**
- 12. Chan KW, Gajewski JL, Supkis D Jr, Pentz R, Champlin R, Bleyer WA. Use of minors as bone marrow donors: current attitude and management. A survey of 56 pediatric transplantation centers. J Pediatr 1996; 128(5):644-48**

13. Committee on Bioethics of the American Academy of Pediatrics. Children as hematopoietic stem cell donors. Pediatrics 2010; 125(2):392-404

14. Pulsipher MA, Levine JE, Hayashi RJ, Chan KW, Anderson P, Duerst R, Osunkwo I, Fisher V, Horn B, Grupp SA. Safety and efficacy of allogeneic PBSC collection in normal pediatric donors: the pediatric blood and marrow transplant consortium experience (PBMTTC) 1996-2003. Bone Marrow Transplant 2005; 35(4):361-7

15. Pulsipher MA, Nagler A, Iannone R, Nelson RM. Weighing the risk of G-CSF administration, leukopheresis, and standard marrow harvest: ethical and safety considerations for normal pediatric hematopoietic cell donors. Pediatr Blood Cancer 2006; 46(4):422-33

16. Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR, Friedrich W, Porta F, Diaz de Heredia C, Wall D, et al.; on behalf of Eurocord and the Inborn Errors Working Party of the EBMT. Transplanting patients with severe combined immune deficiencies (SCID): mismatched related stem cells or unrelated cord blood? Blood 2012; 119(12):2949-55

- Internal revision by: Prof. Dr. Petr Sedláček, Charles University, Prague, Czech Republic

- External revision by: Prof. Dr. Wolfram Ebell, Charite University, Berlin, Germany

- Edited by: Corinne Can