

Źródła komórek macierzystych krwiotworzenia dla potrzeb transplantacji

Sources of hematopoietic stem cells for transplantation

Источники стволовых клеток кровеобразования для нужд трансплантации

Ośrodek Przeszczepiania Szpiku Kliniki Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny.

Kierownik Ośrodka Przeszczepiania Szpiku CSK MON WIM: prof. nadzw. dr hab. n. med. Piotr Rzepecki

Correspondence to: Prof. nadzw. dr hab. n. med. Piotr Rzepecki, ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa, tel./faks: 22 681 65 59, 22 610 30 98,

e-mail: piotr_rzepecki@poczta.onet.pl

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Początki przeszczepiania szpiku sięgają lat 50., lecz dynamiczny rozwój tej metody leczniczej stosowanej w terapii wielu schorzeń nastąpił w ostatnich 23 latach. W transplantologii narządów przeszczepiania szpiku kostnego zajmują drugie miejsce po przeszczepieniach nerek. Ta metoda leczenia rozwija się również bardzo szybko w Polsce. W okresie ostatnich 10 lat liczba różnych form transplantacji wzrosła w naszym kraju 100-krotnie: z 6 zabiegów wykonanych w 1989 roku do ponad 700. W zasadzie termin *transplantacja szpiku* (*bone marrow transplantation*, BMT), używany również w nazwach międzynarodowych towarzystw i rejestrów, jest określeniem potocznym (np. EBMT – European Group for Blood and Marrow Transplantation). Właściwe jest określenie *przeszczepianie komórek krwiotwórczych* (*haematopoietic cell transplantation*, HCT). Wynika to z faktu, że komórki do przeszczepu można uzyskać nie tylko ze szpiku, ale również z krwi obwodowej lub krwi pępowinowej. Termin *przeszczepienie komórek krwiotwórczych* ma szerszy zasięg i obejmuje: klasyczne przeszczepienie szpiku kostnego, pobranego w sali operacyjnej; przeszczepienie komórek z krwi obwodowej (*peripheral blood stem cell transplantation*, PBSCT); przeszczepienie komórek z krwi pępowinowej. Na powierzchni wszystkich komórek macierzystych krwiotworzenia wykrywana jest ekspresja antygenu CD34+, glikozylowanego białka transbłonowego, należącego do rodziny cząsteczek adhezyjnych. W szpiku kostnym osób zdrowych ekspresja tego antygenu wynosi 1-3%, we krwi obwodowej waha się w granicach 0,01-0,1%, natomiast w krwi pępowinowej – 0,1-0,4%. Pierwszym źródłem (materiałem transplantacyjnym) komórek macierzystych krwiotworzenia był szpik kostny, znacznie później, bo w latach 80. ubiegłego stulecia, rozpoczęto przeszczepianie komórek macierzystych z krwi obwodowej (PBSC) oraz krwi pępowinowej.

Słowa kluczowe: przeszczepianie krwiotwórczych komórek macierzystych, szpik kostny, krew obwodowa, krew pępowinowa, mobilizacja komórek macierzystych krwiotworzenia, czynniki wzrostu

Summary

Bone marrow transplantation dates back to the '50s, but greatest progress in this therapeutic modality applied successfully in the treatment of several conditions took place mostly during the past 25 years. Among all organ transplantations, bone marrow transplants are second only to kidney transplants. In Poland this therapeutic technique also undergoes a rapid development. During the past 10 years, absolute numbers of various forms of transplantation increased 100-fold, starting from 6 procedures in 1989 to over 700 at present. Essentially, the term *bone marrow transplantation* (BMT), present in names of international associations and registers, is in fact a colloquialism (e.g. European Group for Blood and Marrow Transplantation). A much more appropriate term would be *hematopoietic cell transplantation* (HCT). This is because progenitor cells for transplantation may be obtained not only from bone marrow, but also from peripheral blood and umbilical cord blood. The term *hematopoietic cell transplantation* has a much broader meaning and includes: classic transplantation of bone marrow obtained at surgery, transplantation of peripheral blood stem cells (PBSCT) and umbilical cord blood-derived stem cells. All hematopoietic stem cells express on their surface the CD34+ antigen and glycosylated transmembrane protein, a member of the family of adhesion molecules. In healthy persons, expression of this antigen in bone marrow cells is at the level of 1-3%, while in peripheral blood – 0.01-0.1%, and in umbilical cord blood – 0.1-0.4%. The first source (transplantation material) of hematopoietic progenitor cells was bone marrow, while

transplantation of stem cells obtained from peripheral blood and umbilical cord blood started much later (during the '80s of the past century).

Key words: hematopoietic stem cells transplantation, bone marrow, peripheral blood, umbilical cord blood, mobilization of hematopoietic stem cells, growth factors

Содержание

Начало пересадки костного мозга относится к 50-м годам прошлого века, однако динамичное развитие этого терапевтического метода применяемого в терапии многих заболеваний наблюдается в течении последних 23 лет. В трансплантологии органов пересадка костного мозга занимает второе место после пересадки почек. Этот метод лечения развивается очень быстро также в Польше. На протяжении последних 10 лет количество различных форм трансплантации увеличилось в нашей стране 100 раз: с 6 операций проведенных в 1989 году до более 700. В принципе термин трансплантация костного мозга (сокр. название на английском языке – БМТ), применяемый также в названиях международных обществ и реестрах, является обиходным определением (например на английском языке ЕБМТ – Европейская группа по трансплантации крови и костного мозга). Правильным является определение пересадка кроветворных клеток (сокр. название на английском языке – ХЦТ). Это вытекает из факта, что клетки для пересадки можно получить не только из костного мозга, но также из периферической крови или крови пуповинной. Название пересадка кроветворных клеток имеет более широкое применение и охватывает: классическую пересадку костного мозга, взятого в операционном зале; пересадку клеток из периферической крови (сокр. название на английском языке – ПБСЦТ); пересадку клеток из пуповинной крови. На поверхности всех стволовых кроветворных клеток обнаруживается появление антигена КД34+, гликозилированного трансмембранного белка принадлежащего к семье адгезивных частиц. В костном мозге здоровых людей выразительность этого антигена составляет 1-3%, в периферической крови колеблется в границах 0,01-0,1%, зато в пуповинной крови – 0,1-0,4%. Первым источником (трансплантационным материалом) стволовых кроветворных клеток является костный мозг. Значительно позднее, в 80-е годы прошлого века, началась пересадка стволовых клеток из периферической крови и крови пуповинной.

Ключевые слова: пересадка стволовых кроветворных клеток, костный мозг, кровь периферическая, кровь пуповинная, мобилизация стволовых кроветворных клеток, факторы роста

Początki przeszczepiania szpiku sięgają lat 50., lecz dynamiczny rozwój tej metody leczniczej stosowanej w terapii wielu schorzeń nastąpił w ostatnich 25 latach. W transplantologii narządów przeszczepiania szpiku kostnego zajmują drugie miejsce po przeszczepieniach nerek. Ta metoda leczenia rozwija się również bardzo szybko w Polsce. Obecnie transplantacje komórek krwiotwórczych są wykonywane w 18 polskich ośrodkach. W krajach Europy Zachodniej liczba transplantacji wykonywanych rocznie wynosi około 400 na 10 milionów mieszkańców. W Polsce liczba ta wynosi 200/10 mln/rok.

Wyróżnia się następujące rodzaje transplantacji szpiku kostnego:

- Przeszczenie alogeniczne, jeśli szpik kostny zgodny w zakresie antygenów I i II klasy układu HLA pochodzi od rodzeństwa, rodziny lub osób niespokrewnionych. Odmianą jest przeszczepienie syngeniczne, gdy dawcą szpiku jest jedno z bliźniąt.
- Przeszczenie autologiczne, gdzie podajemy choremu jego własny szpik, który w stanie niezmienionym lub po oczyszczeniu z komórek nowotworowych przechowywany był przez pewien czas w stanie zamrożenia do -196°C.

Wśród chorych kwalifikowanych do przeszczepienia alogenicznego i posiadających rodzeństwo tylko 25% ma szansę mieć zgodną w układzie HLA siostrę lub brata. Tego typu dawca

Beginnings of bone marrow transplantation date back to the '50s, but a dynamic development of this therapeutic modality used in the treatment of several diseases took place during the past 25 years. Among all organ transplantations, bone marrow transplantation is second only to kidney transplantation. Also in Poland, this therapeutic technique gains in popularity and currently hematopoietic cell transplantations are performed in 18 centers nationwide. In Western European countries, average annual number of transplantation procedures is estimated at 400 per 10 million people. In Poland, the corresponding value would be 200 per 10 million. The following types of bone marrow transplantation are recognized:

- Allogenic transplantation, when bone marrow concordant in class I and II HLA antigens is obtained from siblings, relatives or from non-related persons. A variant thereof is syngenic transplantation, when one of twins in bone marrow donor.
- Autologous transplantation, when patient receives his/her own bone marrow, either unaltered or devoid of cancer cells, deep-frozen (-196°C) and preserved for some time.

Patients qualified for allogenic transplantation and endowed with siblings, have a 25% chance of having a HLA-concordant sister or brother. This kind of donor is optimal. Among patients necessitating allogenic transplantation, only about 70% will find an appropriate donor among siblings or non-related

jest optymalny. Wśród chorych, u których konieczne jest wykonanie alogenicznej transplantacji, tylko około 70% znajduje dawcę wśród rodzeństwa lub dawcę niespokrewnionego w rejestrach polskich, europejskich czy światowych. Dla pozostałych rozwiązaniem może być znalezienie dawcy spokrewnionego niebędącego rodzeństwem. Możemy go znaleźć w przypadkach, gdy:

- rodzice są spokrewnieni;
- dzieci pochodzą z rodzin, w których dwóch braci poślubiło dwie siostry;
- biorca ma szczególnie często występujący haplotyp;
- biorca ma część popularnego haplotypu.

W razie braku innych dawców, wobec istnienia szczególnie dużego zagrożenia biorcy u młodych chorych możemy zdecydować się na wykonanie przeszczepienia od dawcy haploidentycznego. Dawca ten ma wspólny haplotyp z biorcą przy niezgodności drugiego haplotypu. Takim dawcą mogą być rodzice i statystycznie co drugie z rodzeństwa. Tego typu transplantacje są obciążone znaczącym odsetkiem ciężkich powikłań.

W zasadzie termin *transplantacja szpiku (bone marrow transplantation, BMT)*, używany również w nazwach międzynarodowych towarzystw i rejestrów, jest określeniem potocznym (np. EBMT – European Group for Blood and Marrow Transplantation). Właściwe jest określenie *przeszczepianie komórek krwiotwórczych (haematopoietic cell transplantation, HCT)*. Wynika to z faktu, że komórki do przeszczepu można uzyskać nie tylko ze szpiku, lecz także z krwi obwodowej lub krwi pępowinowej. Termin *przeszczepianie komórek krwiotwórczych* ma szerszy zasięg i obejmuje:

- klasyczne przeszczepienie szpiku kostnego, pobranego w sali operacyjnej;
- przeszczepienie komórek z krwi obwodowej (*peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT*);
- przeszczepienie komórek z krwi pępowinowej⁽¹⁻⁴⁾.

Na powierzchni wszystkich komórek macierzystych krwiotworzenia wykrywana jest ekspresja antygenu CD34+, glikozylowanego białka transbłonowego należącego do rodziny cząsteczek adhezyjnych. W szpiku kostnym osób zdrowych ekspresja tego antygenu wynosi 1-3%, we krwi obwodowej waha się w granicach 0,01-0,1%, natomiast w krwi pępowinowej – 0,1-0,4%. Pierwszym źródłem (materiałem transplantacyjnym) komórek macierzystych krwiotworzenia był szpik kostny; znacznie później, bo w latach 80. ubiegłego stulecia, rozpoczęto przeszczepianie komórek macierzystych z krwi obwodowej (PBSC) oraz krwi pępowinowej⁽⁵⁾.

SZPIK KOSTNY⁽¹⁻⁴⁾

Szpik kostny pobieramy operacyjnie w znieczuleniu ogólnym dożylnym bądź dotchawiczym metodą wielokrotnych nakłuć talerzy biodrowych w okolicach kolców biodrowych przednich i tylnych. Maksymalna ilość szpiku kostnego, którą możemy uzyskać od dawcy, to 20 ml/kg jego masy ciała. Minimalna ilość komórek konieczna w celu przyjęcia się przeszczepu w organizmie biorcy to:

persons in Polish, European and global registries. For the rest, a viable solution might be to find a related donor among non-siblings. This may take place when:

- patients' parents are related;
- in patients' families two brothers married two sisters;
- recipient has a frequently occurring haplotype;
- recipient has a part of a popular haplotype.

If other donors are lacking or facing an extraordinary health risk in young patients, we may decide to transplant from a haploidentical donor. Such a donor shares a common haplotype with the recipient, while the other haplotype is discordant. Such donors include parents and, statistically, every other sibling. Nevertheless, this type of transplantation is associated with a significant complication rate.

Essentially, the term *bone marrow transplantation (BMT)*, used also in names of international associations and registries, is a colloquialism (e.g. European Group for Blood and Marrow Transplantation). A far more appropriate term is *hematopoietic cell transplantation (HCT)*. This stems from the fact that progenitor cell for transplantation may be obtained not only from bone marrow, but also from peripheral and umbilical cord blood. The term *hematopoietic cell transplantation* has a much broader meaning and encompasses:

- classic transplantation of bone marrow obtained during surgery;
- peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT);
- transplantation of progenitor cells obtained from umbilical cord blood⁽¹⁻⁴⁾.

All hematopoietic stem cells express on their surface the CD34+ antigen and glycosylated transmembrane protein, a member of the family of adhesion molecules. In healthy persons, expression of this antigen in bone marrow is at the level of 1-3%, in peripheral blood – 0.01-0.1%, and in umbilical cord blood – 0.1-0.4%. The first source (transplantation material) of hematopoietic progenitor cells was bone marrow; transplantation of stem cells obtained from peripheral blood (PBSC) and umbilical cord blood started much later (during the '80s of the past century)⁽⁵⁾.

BONE MARROW⁽¹⁻⁴⁾

Bone marrow is collected surgically under general intravenous or endotracheal anesthesia by repeated punctures of iliac wings at anterior or posterior iliac spines. Maximum amount of bone marrow obtained from a donor is 20 ml/kg of his/her body-weight. The minimum numbers of cells necessary for "taking" of the graft in host organism are:

- nuclear bone marrow cells: $2-3 \times 10^8$ /kg of recipient's body-weight;
- progenitor cells expressing the CD34 antigen on their surface: 1×10^6 /kg of recipient's body-weight.

PERIPHERAL BLOOD

Under normal conditions, peripheral blood contains nearly 100-fold less hematopoietic progenitor cells than bone marrow.

- komórki jądrzaste szpiku kostnego: $2-3 \times 10^8/\text{kg}$ biorycy;
- komórki macierzyste (posiadające na swojej powierzchni antygen CD34): $1 \times 10^6/\text{kg}$ biorycy.

KREW OBWODOWA

We krwi obwodowej w warunkach normy znajduje się około stu razy mniej krwiotwórczych komórek niż w szpiku kostnym. Liczbę tę można zwiększyć dwiema metodami (zwanymi mobilizacją komórek krwiotwórczych):

- Podając hematopoetyczne czynniki wzrostowe, tj. G-CSF lub rzadziej GM-CSF, powodujące przechodzenie komórek krwiotwórczych ze szpiku do krwi. Metodę tę stosujemy w przypadku zdrowych dawców i w przypadkach przeszczepień autologicznych komórek krwiotwórczych u chorych bez obecności resztkowej choroby nowotworowej bądź u „ciężko przeleczonych” pacjentów.
- Stosując kurs chemioterapii (najczęściej cyklofosfamid w dawce około 4 g/m^2) z następową podażą G-CSF. Wśród innych schematów chemioterapii najczęściej są stosowane: IVE (ifosfamid, etopozyd i epirubicyna), VAD (winkrystyna, adriamycyna, deksametazon), ICE (ifosfamid, karboplatyna, etopozyd) oraz DEXA-BEAM (deksametazon, BCNU, etopozyd, arabinozyd cytozyny i melfalan). Metodą tą posługujemy się w przypadkach chorych do przeszczepienia autologicznych komórek krwiotwórczych, zwłaszcza gdy obecna jest u nich resztkowa choroba nowotworowa. Metoda ta pozwala kojarzyć dalsze leczenie (dalszą redukcję masy nowotworu) z wydajnym zbieraniem komórek macierzystych^(6,7).

Czas kolekcji krwiotwórczych komórek z krwi obwodowej ustala się w następujący sposób:

- U zdrowych dawców i chorych mobilizowanych za pomocą samego G-CSF w dawce $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$ zbiórki krwiotwórczych komórek macierzystych rozpoczyna się w 5. dobie stosowania czynnika wzrostu. Większość zdrowych dawców mobilizuje się dobrze i uzyskuje się od nich $4-5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ po 1-2 aferezach.
- Dawka G-CSF 2 razy dziennie po $5-6 \mu\text{g}/\text{kg}$ jest wydajniejsza pod względem ilości uzyskanych komórek CD34+ w porównaniu z pojedynczą dawką dobową G-CSF $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

U chorych mobilizowanych za pomocą chemioterapii z następową podażą G-CSF istnieją trzy możliwości ustalenia optymalnego momentu rozpoczęcia aferezy:

- Pierwsza afereza w II dobie, gdy po okresie neutropenii leukocytoza osiąga wartość $1,0 \text{ G/L}$; zwykle leukaferazy rozpoczyna się około 14.-17. doby od przeprowadzenia chemioterapii.
- Monitorowanie ilości krążących komórek CD34+ (począwszy od 10.-11. dnia od podania cyklofosfamidu) i rozpoczęcie aferez następnego dnia po stwierdzeniu wartości CD34+ $\geq 20/\mu\text{L}$. Wtedy 94% chorych po jednej aferezie uzyskuje $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ (nieskuteczna mobilizacja, gdy CD34+ $< 10/\mu\text{L}$).
- Ocena ilości CIC (*circulating immature cells*), tj. liczby krążących niedojrzałych komórek: promielocytów, mielocytów, metamielocytów i erythroblastów. Jeśli ich ilość wynosi $\geq 1,0 \text{ G/L}$, w 75% przypadków udaje się uzyskać $\geq 1,0 \times 10^6/\text{kg}$

This cipher may be increased by two techniques, the so-called mobilization of hematopoietic cells:

- Administration of hematopoietic growth factors, i.e. G-CSF or, less frequently, GM-CSF, induces passage of hematopoietic cells from bone marrow to blood. This technique is applicable to healthy donors and in the case of transplantation of autologous hematopoietic cells in patients with no detectable residual neoplastic disease or in “heavily-treated” patients.
- A course of chemotherapy (usually cyclophosphamide, 4 g/m^2) with subsequent administration of G-CSF. Other most often used protocols of chemotherapy include: IVE (ifosfamide, etoposide, epirubicin), VAD (vincristine, adriamycin, dexamethasone), ICE (ifosfamide, carboplatin, etoposide) and DEXA-BEAM (dexamethasone, BCNU, etoposide, cytosine arabinoside and melphalan). This technique is used in patients prepared for transplantation of autologous hematopoietic cells, particularly in the presence of residual disease. This technique enables combination of further treatment (reduction of tumor mass) with effective harvesting of progenitor cells^(6,7).

Schedule of collection of hematopoietic cells from peripheral blood is determined in the following way:

- In healthy donors and patients mobilized by G-CSF alone ($10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$), harvesting of hematopoietic stem cells is begun on the 5th day of administration of growth factor. Most healthy donors mobilize well and after 1-2 aphereses provide $4-5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+.
- B.i.d. dose of $5-6 \mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF is more effective in terms of numbers of harvested CD34+ cells as compared with once-a-day $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF dose⁽⁸⁻¹⁰⁾.

In patients mobilized using chemotherapy followed by application of G-CSF, there are three ways of determination of optimal timing of initiation of aphereses:

- First apheresis on day 2, when after transient neutropenia, leucocyte level reaches 1.0 G/L ; leukaphereses are usually begun by the days 14-17 since chemotherapy.
- Monitoring of numbers of circulating CD34+ cells (starting on days 10-11 since administration of cyclophosphamide) and starting aphereses on the next day after CD34+ level reached or exceeded $20/\mu\text{L}$. By then, 94% of patients obtain over $2 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ (mobilization is considered ineffective when CD34+ cells are below $10/\mu\text{L}$);
- Assessment of circulating immature cells (CIC), i.e. numbers of circulating immature promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes and erythroblasts. If they exceed 1.0 G/L , a single apheresis encompassing twice the volume of donor's circulating blood volume may yield over $1.0 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ in 75% of the cases⁽¹¹⁻¹³⁾.

Harvesting (separation) of hematopoietic cells from peripheral blood is performed using cellular separators (most often COBE Spectra or Bacter Fenwal). They process 10-12 L of blood during a single apheresis, isolating mononuclear cells among which are hematopoietic progenitor cells (under light microscopy they are indistinguishable from a small lymphocyte). Aphereses are performed during 2-4 consecutive days.

CD34+ w czasie jednej aferezy obejmującej opracowanie dwóch objętości krwi krążącej dawcy⁽¹¹⁻¹³⁾.

Zbiórek (separacji) komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej dokonujemy za pomocą separatorów komórkowych, najczęściej COBE Spectra lub Baxter Fenwal, które w trakcie jednej aferezy poddają obróbce około 10-12 litrów krwi w celu pozyskania z niej komórek jednojądrzastych, wśród których znajdują się komórki macierzyste krwiotworzenia (w mikroskopie świetlnym są one nie do odróżnienia od małego limfocyta). Aferezy przeprowadza się przez 2-4 kolejne dni.

MECHANIZM DZIAŁANIA G-CSF⁽¹⁴⁾

Mechanizm proteazozależny (katepsyna G, elastaza neutrofilowa, metaloproteinaza-9):

- rozkład molekuł adhezyjnych: VCAM-1, c-kit, CXCR4, SDF-1 α .

Mechanizm proteazozależny:

- redukcja aktywności osteoblastów;
- zmniejszenie ekspresji mRNA SDF-1 α .

FILGRASTIM VS LENOGRASTIM VS MOLGRAMOSTIM⁽¹⁵⁾

- Dawka poszczególnych czynników wzrostu 5 μ g/kg/dobę (od +1. doby po zakończeniu chemioterapii: epirubicyna/adriamycyna \pm paklitaksel lub cyklofosfamid albo inne rodzaje chemioterapii).
- Brak statystycznie znamiennych różnic w ilości uzyskanych CD34+.
- Mediana czasu stosowania G-CSF (od najkrótszego): lenograstim > filgrastim > molgramostim ($p < 0,0001$).
- Częstość i czas trwania neutropenii – najlepszy lenograstim ($p = 0,001$).
- Toksyczność zbliżona.

FILGRASTIM VS LENOGRASTIM^(16,17)

- Badania *in vitro* wskazują, że aktywność lenograstimu jest o 27% większa niż filgrastimu.
- Przeprowadzono badanie porównawcze na 40 chorych poddanych przeszczepieniu autologicznych komórek krwiotwórczych.
- Grupy pacjentów były jednorodne:
 - 20 – filgrastim w dawce 10 μ g/kg/dobę;
 - 20 – lenograstim w dawce 7,5 μ g/kg/dobę.
- Skuteczność mobilizacji 95%, porównywalne mediany:
 - liczby CD34+;
 - liczby aferez.

Ilość komórek CD34+ zebranych z krwi obwodowej niezbędna do przyjęcia się przeszczepu wynosi:

1. Minimalna ilość komórek CD34+ niezbędna do przyjęcia się przeszczepu nie jest ustalona. Większość ośrodków przyjmuje wartość co najmniej 2-2,5 $\times 10^6$ /kg biorcy.
2. Chorzy, którzy otrzymali ilość komórek CD34+ pomiędzy 1,17 a 1,5 $\times 10^6$ /kg, mieli dłuższą odnowę układu

MECHANISM OF ACTION OF G-CSF⁽¹⁴⁾

Protease-dependent mechanism (cathepsin G, neutrophil elastase, metalloproteinase-9):

- disintegration of adhesion molecules (VCAM-1, c-kit, CXCR4, SDF-1 α).

Protease-independent mechanism:

- reduction of osteoblast activity;
- reduction of mRNA SDF-1 α expression.

FILGRASTIM VS. LENOGRASTIM VS. MOLGRAMOSTIM⁽¹⁵⁾

- Dose of particular growth factors: 5 μ g/kg/d (starting on +1st day after termination of chemotherapy epirubicin/adriamycin \pm paclitaxel or cyclophosphamide or other type).
- No statistically significant differences in CD34+ yield.
- Median duration of G-CSF administration (starting by the shortest): lenograstim > filgrastim > molgramostim ($p < 0,0001$).
- Incidence and duration of neutropenia – lenograstim was the best ($p = 0,001$).
- Toxicity was similar.

FILGRASTIM VS. LENOGRASTIM^(16,17)

- *In vitro* studies indicate that lenograstim is superior to filgrastim in terms of activity by 27%.
- Comparative studies recruited 40 patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation.
- Homogenous subgroups of patients were created, receiving:
 - filgrastim (10 μ g/kg/d; n=20);
 - lenograstim (7.5 μ g/kg/d; n=20).
- Effectiveness of mobilization: 95%; similar medians for:
 - number of CD34+ cells;
 - number of aphereses performed.

Number of CD34+ cells isolated from peripheral blood necessary for acceptance of graft:

1. To date, minimal number of CD34+ cells has not been established. Most centers adopted the level of 2-2.5 $\times 10^6$ /kg of recipient's body weight.
2. Patients receiving 1.5-1.7 $\times 10^6$ CD34+ cells per kilogram experienced slower restoration of their granulocyte count, while 10% of them demonstrated a significantly delayed resumption of platelet-generating cell line. Duration of thrombocyte regeneration was adversely affected by such factors as: use of alkylating agents at myelosuppressive doses (ablation protocol), treatment-resistant disease and treatment of acute myeloblastic leukemia. Granulocyte regeneration was also adversely affected by treatment of chronic myeloblastic leukemia and therapy-resistant disease. These factors did not compromise regeneration of hematopoietic progenitor cells in persons receiving 2 $\times 10^6$ CD34+ cells per kilogram.
3. In view of data quoted in #2, we may safely assume that the minimal number of CD34+ cells administered during transfusion is over 1.0 $\times 10^6$ for patients with no risk factors [those

granulocytarnego, a 10% pacjentów miało zdecydowanie opóźnioną regenerację układu płytkotwórczego. Na czas regeneracji układu płytkotwórczego ujemny wpływ miały takie czynniki, jak: zastosowanie leków alkilujących w reżimie ablacyjnym, oporność choroby na leczenie i leczenie z powodu ostrej białaczki szpikowej. Na wydłużenie czasu regeneracji układu granulocytarnego ujemny wpływ miały: leczenie z powodu przewlekłej białaczki szpikowej, oporność choroby na terapię. Wspomniane czynniki nie miały wpływu na regenerację u chorych, którzy otrzymali $>2 \times 10^6/\text{kg}$ biorcy komórek CD34+.

- Biorąc pod uwagę dane z Ad 2, można założyć, że minimalna ilość CD34+, którą należy podać w przeszczepie, wynosi $>1,0 \times 10^6/\text{kg}$ dla chorych bez czynników ryzyka [dla tych, którzy uprzednio nie otrzymywali cytostatyków uszkadzających komórki macierzyste: karmustyny (BCNU), melfalanu, lomustyny (CCNU) i nitrogranulogenu] i $\geq 2,0 \times 10^6/\text{kg}$ biorcy dla innych chorych.
- Przetoczenie większej liczby komórek CD34+ prowadzi do szybszej regeneracji układu krwiotwórczego po transplantacji^(12,18,19).
- Optymalna ilość przetoczonych komórek CD34+ zawiera się pomiędzy 5 a $8 \times 10^6/\text{kg}$ biorcy, stwierdza się wtedy statystycznie znaczącą redukcję liczby powikłań gorączkowych i ilości stosowanych antybiotyków^(12,20).
- W przypadkach przeszczepień alogenicznych komórek krwiotwórczych od w pełni zgodnego rodzeństwa przetoczenie $>8,3 \times 10^6/\text{kg}$ biorcy komórek CD34+ jest związane ze wzrostem śmiertelności w wyniku rozwoju przewlekłej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi^(12,21,22).
- Z uwagi na istnienie ujemnej korelacji pomiędzy prawdopodobieństwem nawrotu choroby a rozwojem przewlekłej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, u chorych z wysokim ryzykiem nawrotu można przetoczyć w trakcie procedury przeszczepienia alogenicznych komórek krwiotwórczych od HLA zgodnego rodzeństwa $>10,5 \times 10^6/\text{kg}$ biorcy komórek CD34+ w celu zminimalizowania ryzyka nawrotu choroby^(12,21).

Do czynników mających ujemny wpływ na ilość uzyskanych w czasie separacji komórek krwiotwórczych należą^(23,24):

- rodzaj uprzednio stosowanej chemioterapii, zastosowanie: nitrogranulogenu, prokarbazyny, busulfanu, melfalanu, karmustyny (lub innych pochodnych nitrozomocznika), analogów puryn, cyklofosfamidu w dawce $>7,5$ g;
- ilość uprzednio stosowanej chemioterapii: liczba kursów chemioterapii >6 (≥ 11 wg innej pracy), czas ekspozycji na chemioterapię >12 miesięcy;
- krótki odstęp pomiędzy ostatnią chemioterapią a mobilizacją (<6 tygodni);
- uprzednio stosowana radioterapia;
- ubogokomórkowy szpik kostny;
- choroba oporna na dotychczas stosowane leczenie.

Clark i Brammer⁽²⁴⁾ opracowali system punktowy pozwalający ocenić szansę chorego na zakończone sukcesem mobilizację w zależności od zastosowanej u niego chemioterapii. Następującym cytostatykom przydzielono określoną liczbę punktów:

not receiving previously progenitor cell-damaging agents – carmustine (BCNU), melphalan, lomustine (CCNU) and nitrogranulogen] and over $2.0 \times 10^6/\text{kg}$ for other patients.

- Transfusion of larger amounts of CD34+ cells results in a rapid regeneration of hematopoietic system after transplantation^(12,18,19).
- The optimal number of transfused CD34+ cells is in the $5-8 \times 10^6/\text{kg}$ range, resulting in a statistically significant reduction of incidence of febrile complications and consumption of antibiotics^(12,20).
- In cases of allogenic transplantations of hematopoietic cells in entirely concordant siblings, administration of over 8.3×10^6 of CD34+ cells is associated with increased mortality due to development of chronic form of graft vs. host reaction^(12,21,22).
- In view of negative correlation between probability of tumor recurrence and development of chronic form of graft vs. host reaction, patients at high-risk of recurrence should receive over 10.5×10^6 of progenitor cells from HLA-concordant sibling in order to minimize the risk of disease recurrence^(12,21).

Factors negatively affecting the number of hematopoietic cells obtained during separation of progenitor cells include^(23,24):

- type of previously administered chemotherapy, use of nitrogranulogen, procarbazine, busulfan, melphalan, carmustine (or other nitrosourea derivatives), purine analogs and cyclophosphamide at the doses over 7.5 g;
- amount of chemotherapy received: number of courses over 6 (or over 11), duration of exposure to chemotherapy over 12 months;
- short interval between last chemotherapy and mobilization (less than 6 weeks);
- a history of radiotherapy used in the past;
- oligo- or acellular bone marrow;
- poor therapeutic response.

Clark and Brammer⁽²⁴⁾ developed a scoring system assessing patient's chances for a successful mobilization, depending on type of chemotherapy. Each family of cytostatics was ascribed a definite score:

- 0 – prednisone, dexamethasone;
- 1 – vincristine, vinblastine, bleomycin, interferon α ;
- 2 – cyclophosphamide, anthracyclines, cisplatin, etoposide, ifosfamide;
- 3 – chlorambucil, procarbazine;
- 4 – melphalan, carmustine, mechlorethamine, lomustine.

Number of past courses of chemotherapy using particular agents is multiplied by their scores. Additional 2 points are added for mediastinal irradiation. A statistically significant difference was noticed between patients with total score under 21 (very good prognosis concerning effective mobilization) and those scoring over 63 (risk of ineffective mobilization) in the quantity of harvested CD34+ cells. At greatest risk of not obtaining an adequate amount of progenitor cells were patients previously treated with melphalan or carmustine.

In patients with malignant non-Hodgkin lymphomas, mobilized using G-CSF only, the following factors adversely affected the number of harvested CD34+ cells:

- 0 – prednizolon; deksametazon;
- 1 – winkrystyna, winblastyna, bleomycyna, interferon α ;
- 2 – cyklofosfamid, antracyklina, cisplatyna, etopozyd, ifosfamid;
- 3 – chlorambucil, prokarbazyna;
- 4 – melfalan, karmustyna, mechloretamina, lomustyna.

Liczbę zastosowanych kursów chemioterapii z użyciem poszczególnych wymienionych leków mnożono przez *score* dla poszczególnych cytostatyków. Dodatkowo 2 punkty dodaje się za zastosowanie napromienienia śródpiersia. Wykazano statystycznie znaczącą różnicę pomiędzy chorymi z *total score* <21 (bardzo dobre rokowanie co do skutecznej mobilizacji) a pacjentami z liczbą punktów >63 (ryzyko nieskutecznej mobilizacji) w ilości uzyskiwanych komórek CD34+. Największe ryzyko nieuzyskania odpowiedniej ilości komórek CD34+ istnieje u chorych, u których uprzednio stosowano melfalan lub karmustynę.

Dla chorych z chłoniakami złośliwymi nieziarniczymi, którzy są mobilizowani tylko za pomocą G-CSF, znaleziono następujące czynniki mające niekorzystny wpływ na ilość uzyskanych komórek CD34+⁽²⁵⁾:

- uprzednio stosowane leczenie fludarabiną;
- zajęcie szpiku kostnego stwierdzone w momencie rozpoznania;
- zajęcie szpiku kostnego w jakimkolwiek czasie przed rozpoczęciem mobilizacji;
- typ histologiczny chłoniaka: grudkowy, z komórek płaszczą, limfoplazmocytoidalny, chłoniak limfocytowy/przewlekła białaczka limfocytowa;
- płeć żeńska.

ZNACZENIE NIESKUTECZNEJ MOBILIZACJI⁽²⁶⁻²⁸⁾

Przy przeszczepieniu autologicznych komórek krwiotwórczych w ziarnicy złośliwej lub chłoniakach nieziarniczych chorzy, u których nie uzyskano odpowiedniej liczby komórek macierzystych krwiotworzenia podczas pierwszej mobilizacji i separacji, mieli:

- dłuższy czas odnowy układu płytkotwórczego;
- krótsze: czas do progresji (PFS) i całkowite przeżycie (OS). Dotyczyło to pacjentów, którzy otrzymali odpowiednią ilość komórek macierzystych krwiotworzenia, uzyskanych podczas kolejnych zabiegów mobilizacji i separacji z krwi obwodowej.

WYBÓR ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO TRANSPLANTACJI

Przy wyborze źródła krwiotwórczych komórek macierzystych do transplantacji najczęściej wykorzystuje się następujące zalecenia⁽²⁹⁾:

- szpik kostny jako materiał zawierający komórki hematopoetyczne jest preferowany w następujących przypadkach:
 1. młodszy chorzy mniejszego ryzyka,
 2. dzieci,
 3. niedokrwistość aplastyczna,
 4. przewlekła białaczka szpikowa w pierwszej fazie przewlekłej;

- previous treatment with fludarabine;
- bone marrow invasion at diagnosis;
- bone marrow invasion at any time prior to initiation of mobilization;
- histological type of lymphoma: nodular, with pallial cells, lymphoplasmacytoid, lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia;
- female gender.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF INEFFECTIVE MOBILIZATION⁽²⁶⁻²⁸⁾

When implanting autologous hematopoietic cells in the setting of malignant Hodgkin or non-Hodgkin lymphomas, patients not achieving an adequate number of progenitor hematopoietic cells at first mobilization and separation experienced:

- an extended time of restoration of their platelet system;
- shorter progression-free survival (PFS) and inferior overall survival.

This is valid for patients receiving an adequate amount of hematopoietic cells obtained during consecutive session of mobilization and separation thereof from peripheral blood.

SELECTION OF SOURCE OF PROGENITOR CELLS FOR TRANSPLANTATION

When choosing the source of hematopoietic cells for transplantation, the following recommendations are usually followed⁽²⁹⁾:

- bone marrow as source of hematopoietic cells is preferred in the following situations:
 1. younger, standard-risk patients;
 2. children;
 3. aplastic anemia;
 4. chronic myeloblastic leukemia in its first chronic phase.
- peripheral blood as source of hematopoietic cells is preferred in the following clinical situations:
 1. late-stage disease;
 2. "graft manipulation" needed;
 3. transplantation using non-myeloablative protocols;
 4. donor decision.

Characteristics of particular sources of hematopoietic cells for transplantation are summarized in table 1.

MANAGEMENT OF INEFFECTIVE MOBILIZATION^(8,30-43)

- Increase of G-CSF dosage (up to 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once or even twice a day).
- Plerixafor (binding CXCR4-SDF-1 α).
- EPO+G-CSF.
- Repeated stimulation.
- Harvesting of bone marrow after previous stimulation by G-CSF (G-CSF stimulated bone marrow or rich bone marrow, RBM).

Plerixafor is a bicyclam-derived, reversible antagonist of chemokine receptor CXCR4. It blocks binding of native

Źródło komórek macierzystych krwiotworzenia <i>Source of hematopoietic stem cells</i>	Charakterystyka <i>Characteristics</i>
Szpik kostny <i>Bone marrow</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pobranie w znieczuleniu ogólnym <i>1. Harvesting requires general anesthesia</i> 2. Ograniczona liczba komórek macierzystych krwiotworzenia <i>2. Limited number of hematopoietic stem cells</i> 3. Mediana liczby komórek jądrzastych: 2×10^8/kg <i>3. Median number of nuclear cells: 2×10^8/kg</i> 4. Mediana liczby komórek CD34+: $2,8 \times 10^6$/kg <i>4. Median number of CD34+ cells: $2,8 \times 10^6$/kg</i> 5. Mediana liczby limfocytów T: $2,2 \times 10^7$/kg <i>5. Median number of T-lymphocytes: $2,2 \times 10^7$/kg</i>
Krew obwodowa (stymulacja G-CSF) <i>Peripheral blood (stimulation by G-CSF)</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pobranie łatwe <i>1. Easy harvesting</i> 2. Nie wymaga znieczulenia ogólnego <i>2. Does not require general anesthesia</i> 3. Działania niepożądane G-CSF <i>3. Adverse effects of G-CSF</i> 4. Znaczna liczba komórek macierzystych krwiotworzenia <i>4. Provides large numbers of stem cells</i> 5. Mediana liczby komórek jądrzastych: 9×10^8/kg <i>5. Median number of nuclear cells: 9×10^8/kg</i> 6. Mediana liczby komórek CD34+: 7×10^6/kg <i>6. Median number of CD34+ cells: 7×10^6/kg</i> 7. Mediana liczby limfocytów T: 27×10^7/kg <i>7. Median number of T-lymphocytes: 27×10^7/kg</i>
Krew pępowinowa <i>Umbilical cord blood</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pobranie łatwe <i>1. Easy harvesting</i> 2. Szybka dostępność dla biorcy <i>2. Ready-to-use</i> 3. Niskie ryzyko przeniesienia chorób infekcyjnych <i>3. Low risk of transmission of infectious diseases</i> 4. Dopuszczalna częściowa niezgodność w antygenach HLA <i>4. Acceptable partial discordance in HLA antigens</i> 5. Mała liczba komórek macierzystych krwiotworzenia w jednostce krwi pępowinowej <i>5. Limited number of hematopoietic stem cells in unit of cord blood</i> 6. Mediana liczby komórek jądrzastych: $0,3 \times 10^8$/kg <i>6. Median number of nuclear cells: $0,3 \times 10^8$/kg</i> 7. Mediana liczby komórek CD34+: $0,2 \times 10^6$/kg <i>7. Median number of CD34+ cells: $0,2 \times 10^6$/kg</i> 8. Mediana liczby limfocytów T: $0,4 \times 10^7$/kg <i>8. Median number of T-lymphocytes: $0,4 \times 10^7$/kg</i>

Tabela 1. Charakterystyka poszczególnych źródeł komórek macierzystych krwiotworzenia dla potrzeb przeszczepienia
Table 1. Characteristics of particular sources of hematopoietic stem cells for transplantation

- krew obwodowa jako źródło komórek macierzystych jest preferowana w następujących sytuacjach klinicznych:
 1. zaawansowana faza choroby,
 2. potrzeba zastosowania „manipulacji graftu”,
 3. transplantacje z zastosowaniem reżimów niemieloablacyjnych,
 4. decyzja dawcy.

Charakterystykę poszczególnych źródeł komórek macierzystych krwiotworzenia dla potrzeb przeszczepienia przedstawiono w tabeli 1.

ligand, stromal factor 1 α (SDF-1 α , another name: CXCL12). The following mechanism of increasing leukocytosis and level of circulating hematopoietic stem cells has been adopted: administration of plerixafor induces rupture of bonds between negative ligand and chemokine receptor CXCR4, resulting in passage of both mature and multipotential cells to circulating blood. Administration of plerixafor induces mobilization of functionally normal CD34+ cells, ready to take over hematopoietic function and hematopoietic repopulation. In two phase III randomized and controlled trials, patients

POSTĘPOWANIE PRZY NIESKUTECZNEJ MOBILIZACJI^(8,30-43)

- Zwiększenie dawki G-CSF (do 16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$ lub nawet 2 razy na dobę po 16 $\mu\text{g}/\text{dawkę}$).
- Plerykksafor (rola wiązania CXCR4-SDF-1 α).
- EPO+G-CSF.
- Ponowna stymulacja.
- Pobranie szpiku kostnego po uprzedniej stymulacji chorego za pomocą G-CSF (G-CSF *stimulated bone marrow* lub *rich bone marrow*, RBM).

Plerykksafor jest pochodną bicyklamową, odwracalnym antagonistą receptora chemokinowego CXCR4. Blokując wiązanie ligandu macierzystego, zrębowego czynnika – 1 α (SDF-1 α , inna nazwa CXCL12). Przyjęto następujący mechanizm zwiększenia leukocytozy i liczby krążących krwiotwórczych komórek macierzystych: po podaniu plerykksaforu następuje zerwanie wiązania natywnego ligandu z receptorem chemokinowym CXCR4, co prowadzi do uwolnienia do krwi krążącej komórek dojrzałych i multipotencjalnych. Po podaniu plerykksaforu dochodzi do mobilizacji prawidłowych funkcjonalnie komórek CD34+ zdolnych do przejęcia funkcji krwiotwórczej i repopulacji hematopoetycznej. W dwóch badaniach III fazy z randomizacją i grupą kontrolną chorzy z rozpoznaniem chłoniaka nieziarnicznego lub szpiczaka mnogiego otrzymywali plerykksafor w dawce 0,24 mg/kg lub placebo wieczorem przed aferezą. Pacjenci otrzymywali G-CSF codziennie rano w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ przez 4 dni przed podaniem pierwszej dawki plerykksaforu lub placebo oraz codziennie rano przed aferezą. Wartość $\geq 5 \times 10^6$ komórek CD34+/kg w ciągu ≤ 4 dni aferezy uzyskano u statystycznie istotnie większej liczby pacjentów otrzymujących plerykksafor i G-CSF (n=89; 59,3%) niż otrzymujących placebo i G-CSF (n=29; 19,6%), $p < 0,001$. Wartość $\geq 2 \times 10^6$ komórek CD34+/kg w ciągu ≤ 4 dni aferezy uzyskano u statystycznie istotnie większej liczby pacjentów otrzymujących plerykksafor i G-CSF (n=130; 86,7%) niż otrzymujących placebo i G-CSF (n=70; 47,3%), $p < 0,001$.

Rich bone marrow, RBM⁽³⁷⁻⁴³⁾:

- wyniki porównywalne z przeszczepieniem komórek macierzystych uzyskanych drogą aferezy z krwi obwodowej;
- mniejsze ryzyko rozwoju choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi;
- brak zwiększonego ryzyka nawrotu choroby;
- pomocny przy nieskutecznej stymulacji komórek macierzystych krwiotworzenia z krwi obwodowej;
- dawki G-CSF podobne jak przy stymulacji komórek macierzystych krwiotworzenia z krwi obwodowej.

KREW PĘPOWINOWA (CB)⁽⁴⁴⁻⁴⁹⁾

Zalety:

- mniejsza dojrzałość układu immunologicznego;
- duża aktywność proliferacyjna (długie telomery);
- mniejsze ryzyko odrzucenia przeszczepu;
- mniejsze ryzyko rozwoju GVHD (duża ilość limfocytów T „dziewiczych”; dużo IL-10);

diagnosed with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma received plerixafor (0.24 mg/kg) or placebo the night before apheresis. Additionally, they received G-CSF everyday morning (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for 4 days prior to administration of the first plerixafor (or placebo) dose and everyday morning prior to apheresis. CD34+ cells' level equal to or exceeding $5 \times 10^6/\text{kg}$ at any of 4 days of apheresis was obtained in significantly more patients treated with plerixafor and G-CSF (n=89, 59%) compared with those receiving placebo and G-CSF (n=29; 19.6%; $p < 0.001$). The level of over 2×10^6 CD34+ cells/kg during at any of 4 days of apheresis was obtained in significantly more patients treated with plerixafor and G-CSF (n=130; 86.7%) than in those receiving placebo and G-CSF (n=70; 47.3%; $p < 0.001$).

Rich bone marrow (RBM)⁽³⁷⁻⁴³⁾:

- results similar to transplantation of progenitor cells obtained by apheresis of peripheral blood;
- reduced risk of graft-versus-host disease;
- lack of increased risk of disease recurrence;
- useful when stimulation of hematopoietic stem cells in peripheral blood proved ineffective;
- G-CSF doses similar to those used to stimulate hematopoietic stem cells in peripheral blood.

UMBILICAL CORD BLOOD (CB)⁽⁴⁴⁻⁴⁹⁾

Advantages:

- less mature immune system;
- enhanced proliferative activity (long telomeres);
- reduced risk of graft rejection;
- reduced risk of graft-versus-host disease (high level of “naive” T-lymphocytes and IL-10);
- safe harvesting (for both mother and child);
- lack of ethical concerns;
- material fully tested and ready-to-use;
- reduced waiting time for allograft as compared with non-related donor (4 weeks vs. 4-6 months);
- need to analyze 6 instead of 10 alleles of HLA antigens;
- acceptable discordance of 2 (in infants even 3) alleles (3-4/6);
- reduced risk presence of viruses (CMV, EBV).

Disadvantages:

- minimum number of nuclear cells: $2 \times 10^7/\text{kg}$;
- CD34+: $1.7-2 \times 10^5/\text{kg}$;
- 100 ml of cord blood contains about 0.3×10^6 CD34+ cells;
- 1 unit of cord blood is sufficient for a person of less than 40 kg;
- maximum volume of cord blood to be harvested: 180 ml;
- unknown morbid status of the newborn and its possible impact on recipient;
- lack of material for donor lymphocyte infusion (DLI);
- lack of material in the case of graft incompetence;
- delayed regeneration of hematopoietic system:
 - polymorphonuclear leucocytes – 28 days,
 - platelets – 52 days.

Techniques for “bypassing” the issue of insufficient number of nuclear cells in cord blood:

- bezpieczne pobranie (dla matki i dziecka);
- brak problemów etycznych;
- materiał całkowicie opracowany i gotowy do przeszczepienia;
- skrócony czas oczekiwania na allo w porównaniu z dawcą niespokrewnionym (4 tygodnie vs 4-6 miesięcy);
- bada się 6, a nie 10 alleli antygenów układu HLA;
- dopuszczalna niezgodność w 2 (u małych dzieci nawet w 3) allelach (3-4/6);
- małe ryzyko obecności wirusów: CMV, EBV.

Wady:

- minimalna ilość komórek jądrzastych: $2 \times 10^7/\text{kg}$;
- CD34+ – $1,7-2 \times 10^5/\text{kg}$;
- 100 ml krwi pępowinowej = około $0,3 \times 10^6/\text{kg}$ komórek CD34+;
- 1 porcja KP wystarcza dla chorych o masie ciała <40 kg;
- maksymalna objętość krwi pępowinowej do pobrania = 180 ml;
- nie wiadomo, jakie choroby posiada noworodek i jaki to będzie miało wpływ na biorcę;
- brak materiału do DLI;
- brak materiału w przypadku niewydolności przeszczepu;
- długi okres odnowy układu krwiotwórczego:
 - granulocyty podzielone około 28 dni,
 - płytki krwi około 52 dni.

Sposoby „ominięcia” zbyt małej ilości komórek jądrzastych w krwi pępowinowej:

- można łączyć kilka porcji CB;
- około +100. dnia dominuje jedna forma komórek (nie HLA, nie CD34+, a ilość CD3+);
- możliwe połączenie: CB + haploidentyczna transplantacja (CD34+ od członka rodziny).

Mimo iż międzynarodowe rejestry liczą już około 5 mln dawców szpiku, w dalszym ciągu nie udaje się znaleźć odpowiedniego materiału przeszczepowego dla około 30-40% chorych. Od 1988 roku nowym źródłem prekursorów hematopoezy, zwiększającym krąg potencjalnych biorców, stała się krew pępowinowa (CB). CB, gromadzona w bankach krwi pępowinowej, jest materiałem całkowicie opracowanym i przygotowanym do przeszczepienia. Dlatego czas oczekiwania biory na jej transplantację jest wielokrotnie krótszy niż w przypadku przeszczepienia szpiku od dawcy niespokrewnionego (około 4 tygodni vs 4-6 miesięcy). Sposób uzyskiwania CB minimalizuje niebezpieczeństwo przeniesienia czynników zakaźnych, w tym wirusów o długim okresie latencji (CMV, EBV). Komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej w porównaniu z komórkami pochodzącymi ze szpiku czy krwi obwodowej są mniej dojrzałe i mniej ukierunkowane. Mniejsza dojrzałość funkcjonalna układu immunologicznego powoduje, że w przypadku alogenicznych przeszczepów komórek macierzystych z krwi pępowinowej ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi jest mniejsze niż w przypadku alogenicznego przeszczepienia szpiku lub komórek hematopoetycznych z krwi obwodowej. Ta dodatkowa zaleta CB powoduje, że przy jej przeszczepianiu nie obowiązuje całkowita zgodność dawcy i biorcy w antygenach układu HLA. Wydaje się jednak, iż reakcja przeszczep przeciwko nowotworowi (*graft-versus-malignancy*, GvM) jest zachowana dzięki działaniu naturalnych

- several units of cord blood may be combined;
- after about 100 days, one cellular type predominates (non-HLA, non-CD34+, but sheer number of CD3+);
- possible haploidentical CD+ transplantation (CD34+ from a relative).

While international registries currently contain data of nearly 5 million bone marrow donors, finding of a suitable transplantation material for 30-40% of patients is impossible. Since 1988, umbilical cord blood became a novel source of hematopoietic precursors, increasing the pool of potential recipients. Cord blood, stored in cord blood banks, is a material fully tested and ready for transplantation. Therefore, time spent awaiting transplantation is several-fold shorter as compared with bone marrow from an unrelated donor (4 weeks vs. 4-6 months). Technique of harvesting cord blood minimizes the risk of transmission of infectious agents, including viruses with a long latency period (CMV, EBV). Compared with cells obtained from bone marrow or peripheral blood, stem cells harvested from cord blood are less mature and less differentiated. Due to a reduced functional maturity of fetal immune system, in the case of allogenic transplant of cord blood stem cells, risk of inducing graft-versus-host disease is much lower than in the case of allogenic transplant of progenitor cells obtained from bone marrow or peripheral blood. Thanks to this additional advantage of cord blood, its transplantation does not require entire concordance of donor and recipient concerning HLA antigens. Nevertheless it appears that graft-versus-malignancy reaction is preserved thanks to the presence of natural killers (NK) and lymphocyte-activated killers (LAK). Cord blood progenitor cells are characterized by an increased production of interleukin 10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine, mediating inhibition of rejection of allogenic transplants. Furthermore, of great value is the option of harvesting cord blood from related donors in order to treat diseased siblings, sometimes also other members of the family. As mentioned before, these particular features of cord blood significantly increase the scope of potential uses of transplantation of hematopoietic stem cells when no suitable donors of bone marrow are available.

In view of great proliferative potential of cord blood, the required minimum number of nuclear cells is much lower than in the case of harvesting hematopoietic stem cells from bone marrow or peripheral blood. The minimum amount of nuclear KKP cells required graft acceptance is about $2 \times 10^7/\text{kg}$ donor body mass, while that of CD34+ cells – $1.7-2 \times 10^5/\text{kg}$. However, an average unit of cord blood contains less hematopoietic stem cells than average unit of harvested bone marrow or “mobilized” peripheral blood. On the average, 100 ml of cord blood contains 0.3×10^6 CD34+ cells per kg, which is enough for a recipient of less than 40 kg. Therefore, most cord blood transplantations reported to date have been performed in children. Adult patients require several units of cord blood in consecutive transplantation sessions, obtained from related or non-related donors (sequenced transplants). In these patients, an alternative would be a transplant from a haploidentical donor or combination of haploidentical graft and cord blood.

killerów i komórek LAK (*lymphocyte activated killer*). Komórki macierzyste krwi pępowinowej cechuje zwiększona produkcja interleukiny-10 (IL-10), przeciwzapalnej cytokiny, która może uczestniczyć w hamowaniu odrzucenia przeszczepów alogenicznych. Bardzo cenna jest ponadto możliwość pobrania CB od dawców rodzinnych z przeznaczeniem dla chorego rodzeństwa, czasem także dla innych członków rodziny. Te szczególne cechy CB pozwalają, jak wspomniano, na istotne zwiększenie możliwości transplantacji macierzystych komórek układu krwiotwórczego u chorych, dla których nie udaje się znaleźć odpowiedniego dawcy szpiku.

Z uwagi na olbrzymi potencjał proliferacyjny CB wymagana minimalna liczba komórek jądrzastych do transplantacji jest znacznie niższa niż w przypadkach, gdy źródłem komórek hematopoetycznych jest szpik kostny lub krew obwodowa. Minimalna ilość komórek jądrzastych KKP potrzebna do przyjęcia się przeszczepu wynosi około 2×10^7 /kg masy ciała biorcy, a komórek CD34+ – $1,7-2 \times 10^5$ /kg masy ciała biorcy. Przeciętna jednostka krwi pępowinowej zawiera jednak mniej krwiotwórczych komórek macierzystych niż przeciętna jednostka pobranego szpiku czy „mobilizowanej” krwi obwodowej. 100 ml krwi pępowinowej zawiera średnio $0,3 \times 10^6$ /kg komórek CD34+, co wystarcza na wykonanie przeszczepienia u człowieka ważącego do 40 kg. Z tego względu większość opisanych dotychczas zabiegów przeszczepienia krwi pępowinowej wykonana była u dzieci. W celu zrealizowania transplantacji u dorosłych konieczne jest wykorzystanie kilku jednostek krwi pępowinowej, w kolejnych przeszczepach pochodzących od dawców spokrewnionych lub niespokrewnionych (przeszczepy sekwencjonowane). Alternatywą dla tych chorych może być przeszczepienie od dawcy haploidentycznego lub skojarzone stosowanie przeszczepu haploidentycznego i krwi pępowinowej. Do kolejnych wad CB jako źródła krwiotwórczych komórek macierzystych należą:

- brak materiału do ponownej transplantacji w przypadkach nawrotu choroby, będącej powodem wykonania transplantacji, braku przyjęcia się bądź odrzucenia przeszczepu czy konieczności zastosowania u biorcy infuzji limfocytów dawcy (DLI);
- opóźnione czasy regeneracji układu granulocytarnego (około 28 dni) i płytkotwórczego (około 52 dni) w porównaniu z innymi źródłami krwiotwórczych komórek macierzystych.

Namnażanie komórek macierzystych hematopoezy CB to, niestety, nadal kwestia przyszłości. Wyniki dotychczas wykonanych w tym zakresie prób są obiecujące.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Hansz J.: Przeszczepianie szpiku kostnego ze wskazań hematologicznych u dorosłych. *Postępy Nauk Med.* 1993; 6: 175-179.
2. Ljungman P., Urbano-Ispizua A., Cavazzana-Calvo M. i wsp.; European Group for Blood and Marrow: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and cur-

Other disadvantages of cord blood as source of hematopoietic stem cells include:

- lack of material for a repeat transplantation in the case of recurrence of disease being the cause for primary transplantation, rejection or lack of take of graft, need for donor lymphocyte infusion (DLI) in the recipient;
- delayed restoration of granulocyte and thrombocyte cell lines (on the average 28 and 52 days, respectively) compared with other sources of hematopoietic stem cells.

In vitro culture of cord blood hematopoietic progenitor cells is still a matter of future. Results of experiments performed to date in this area are promising.

3. Johnsen H.E., Lanza F., Fruehauf S. i wsp.: Sources and procurement of HSC. W: Apperley J.F., Carreras E., Gluckman E. i wsp. (red.): *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. Forum Service Editore, Genoa 2004; 79-91.
4. Urbano-Ispizua A., Schmitz N., de Witte T. i wsp.; European Group for Blood and Marrow Transplantation: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 639-646.
5. Tarach J.S.: Hematopoetyczne komórki macierzyste szpiku kostnego i antygen CD34. *Acta Haematol. Pol.* 1999; 30: 225-233.
6. Leung A.Y.H., Kwong Y.L.: Haematopoietic stem cell transplantation: current concepts and novel therapeutic strategies. *Br. Med. Bull.* 2010; 93: 85-103.
7. Koumakis G., Vassilomanolakis M., Barbounis V. i wsp.: Optimal timing (preemptive versus supportive) of granulocyte colony-stimulating factor administration following high-dose cyclophosphamide. *Oncology* 1999; 56: 28-35.
8. Kröger N., Renges H., Sonnenberg S. i wsp.: Stem cell mobilisation with $16 \mu\text{g}/\text{kg}$ vs $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ of G-CSF for allogeneic transplantation in healthy donors. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 727-730.
9. Bensinger W., DiPersio J.F., McCarty J.M.: Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43: 181-195.
10. Arbona C., Prosper F., Benet I. i wsp.: Comparison between once a day vs twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in normal donors for allogeneic PBPC transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 39-45.
11. Armitage S., Hargreaves R., Samson D. i wsp.: CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 587-591.
12. Reddy R.L.: Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 2005; 32: 63-72.
13. Hill Q.A., Buxton D., Pearce R. i wsp.: An analysis of the optimal timing of peripheral blood stem cell harvesting following priming with cyclophosphamide and G-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 925-930.
14. Ketterer N., Salles G., Raba M. i wsp.: High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3148-3155.

15. Kopf B., De Giorgi U., Vertogen B. i wsp.: A randomized study comparing filgrastim versus lenograstim versus molgramostim plus chemotherapy for peripheral blood progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 407-412.
16. Declève E., Cramer R., Zabcuch G.: Glycosylation improves the priming effect exerted by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) on human neutrophil superoxide production. *Int. J. Tissue React.* 1995; 17: 191-198.
17. Ataergin S., Arpacı F., Turan M. i wsp.: Reduced dose of lenograstim is as efficacious as standard dose of filgrastim for peripheral blood stem cell mobilization and transplantation: a randomized study in patients undergoing autologous peripheral stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* 2008; 83: 644-648.
18. Villalón L., Odrojzola J., Laraña J.G. i wsp.: Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation with $<2 \times 10^6$ CD34⁺/kg: an analysis of variables concerning mobilisation and engraftment. *Hematol. J.* 2000; 1: 374-381.
19. Gandhi M.K., Jestice K., Scott M.A. i wsp.: The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 9-13.
20. Scheid C., Draube A., Reiser M. i wsp.: Using at least 5×10^6 /kg CD34⁺ cells for autologous stem cell transplantation significantly reduces febrile complications and use of antibiotics after transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 1177-1181.
21. Sohn S.K., Kim J.G., Kim D.H. i wsp.: Impact of transplanted CD34⁺ cell dose in allogeneic unmanipulated peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 967-972.
22. Mohty M., Bilger K., Jourdan E. i wsp.: Higher doses of CD34⁺ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia* 2003; 17: 869-875.
23. Harousseau J.L., Moreau P.: Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 2645-2654.
24. Clark R.E., Brammer C.G.: Previous treatment predicts the efficiency of blood progenitor cell mobilisation: validation of a chemotherapy scoring system. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 859-863.
25. Micallef I.N., Apostolidis J., Rohatiner A.Z. i wsp.: Factors which predict unsuccessful mobilisation of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. J.* 2000; 1: 367-373.
26. Pavone V., Gaudio F., Console G. i wsp.: Poor mobilization is an independent prognostic factor in patients with malignant lymphomas treated by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37: 719-724.
27. Tomblyn M., Burns L.J., Blazar B. i wsp.: Difficult stem cell mobilization despite adequate CD34⁺ cell dose predicts shortened progression free and overall survival after autologous HSCT for lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 111-118.
28. Bolwell B.J., Pohlman B., Rybicki L. i wsp.: Patients mobilizing large numbers of CD34⁺ cells ('super mobilizers') have improved survival in autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 437-441.
29. Urbano-Ispizua A.: Stem cell product for allo-SCT. Tenth ESH-EBMT Training Course on Haemopoietic Stem Cell Transplantation; 24-28.05.2006 r., Warszawa, Polska, materiały zjazdowe.
30. Stiff P., Micallef I., McCarthy P. i wsp.: Treatment with plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients to increase the number of peripheral blood stem cells when given a mobilizing regimen of G-CSF: implications for the heavily pretreated patient. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009; 15: 249-256.
31. Calandra G., McCarty J., McGuirk J. i wsp.: AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34⁺ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 331-338.
32. Devine S.M., Vij R., Rettig M. i wsp.: Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 2008; 112: 990-998.
33. Pusic I., Jiang S.Y., Landua S. i wsp.: Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 1045-1056.
34. Cashen A., Lopez S., Gao F. i wsp.: A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 1253-1261.
35. Hart C., Grassinger J., Andreesen R., Hennemann B.: EPO in combination with G-CSF improves mobilization effectiveness after chemotherapy with ifosfamide, epirubicin and etoposide and reduces costs during mobilization and transplantation of autologous hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43: 197-206.
36. Watts M.J., Ings S.J., Flynn M. i wsp.: Remobilization of patients who fail to achieve minimal progenitor thresholds at the first attempt is clinically worthwhile. *Br. J. Haematol.* 2000; 111: 287-291.
37. Seshadri T., Al-Farsi K., Stakiw J. i wsp.: G-CSF-stimulated BM progenitor cells supplement suboptimal peripheral blood hematopoietic progenitor cell collections for auto transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42: 733-737.
38. Chiang K.Y., Worthington-White D.: The clinical significance of different hematopoietic stem cell sources (primed marrow, mobilized blood, and steady-state marrow) in autologous and allogeneic transplantation. *Exp. Hematol.* 2004; 32: 698-699.
39. Elfenbein G.J., Sackstein R., Oblon D.J.: Do G-CSF mobilized, peripheral blood-derived stem cells from healthy, HLA-identical donors really engraft more rapidly than do G-CSF primed, bone marrow-derived stem cells? No! *Blood Cells Mol. Dis.* 2004; 32: 106-111.
40. Chen Y., Huang X., Xu L. i wsp.: A pilot study of G-CSF mobilized allogeneic bone marrow cells plus peripheral blood stem cells transplantation for malignant hematological diseases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 1306-1309.
41. Ji S.Q., Chen H.R., Wang H.X. i wsp.: Comparison of outcome of allogeneic bone marrow transplantation with and without granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) donor-marrow priming in patients with chronic myelogenous leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2002; 8: 261-267.
42. Ji S.Q., Chen H.R., Xun C.Q. i wsp.: The effect of G-CSF-stimulated donor marrow on engraftment and incidence of graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Transplant.* 2001; 15: 317-323.
43. Ostronoff M., Ostronoff F., Souto Maior P. i wsp.: Pilot study of allogeneic G-CSF-stimulated bone marrow transplantation: harvest, engraftment, and graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2006; 12: 729-733.

44. Sanberg P.R., Willing A.E., Garbuzova-Davis S. i wsp.: Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1049: 67-83.
45. Ballen K.K.: New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2005; 105: 3786-3792.
46. Urbanowska E., Jędrzejczak W.W.: Krew pępowinowa jako źródło komórek krwiotwórczych do przeszczepienia. *Acta Haematol. Pol.* 2004; 35 supl. 1: 87-94.
47. Jarosca J., Goltry K., Smith A. i wsp.: Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell system. *Blood* 2003; 101: 5061-5067.
48. Korycka A., Robak T.: Komórki macierzyste krwi pępowinowej – nadzieje i rzeczywistość. *Acta Haematol. Pol.* 2005; 36: 389-398.
49. He X., Gonzalez V., Tsang A. i wsp.: Differential gene expression profiling of CD34+ CD133+ umbilical cord blood hematopoietic stem progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 188-198.

Hotel STOK ****, Wisła, 10-11 marca 2012 r.



Organizatorzy:

- Klinika Chemioterapii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- Wydawnictwo Forum

Kierownik Naukowy:

- dr hab. n. med. Piotr Potemski, prof. UM

Biuro organizacyjne:

Wydawnictwo FORUM Sp. z o.o.
ul. Polska 13, 60-595 Poznań
tel. 61 66 55 800, faks 61 66 55 888
infolinia@e-forum.pl

Program

SESJA I – Leczenie skojarzone raka odbytnicy

- Diagnostyka przedoperacyjna – dlaczego nie wystarcza TK?
- Rola chirurgii
- Rola radioterapii i chemioterapii

SESJA II – Leczenie uzupełniające najczęstszych nowotworów

- Rak okrężnicy – czy leczyć chorych z II stopniem zaawansowania?
- Rak piersi – kiedy stosować chemioterapię u chorych ER+?
- Niedrobnokomórkowy rak płuca – kogo leczyć?

SESJA III – Praktyczna interna w onkologii

- Problemy kardiologiczne
- Zaburzenia wodne, elektrolitowe i gospodarki kwasowo-zasadowej
- Stany zakrzepowo-zatorowe

SESJA IV – Leczenie ukierunkowane molekularnie – już terapia spersonalizowana czy jeszcze empiryczna?

- Przegląd zarejestrowanych leków
- Punkt widzenia biologa molekularnego
- Punkt widzenia klinicysty

SESJA V – Zapobieganie i leczenie powikłań terapii systemowej

- Neutropenia
- Nudności i wymioty
- Powikłania leczenia ukierunkowanego molekularnie

SESJA VI – Omówienie przypadków klinicznych

- Diagnostyka obrazowa w onkologii
- Leczenie uzupełniające raka piersi
- Leczenie niedrobnokomórkowego raka płuca
- Terapia celowana raka nerki
- Leki ukierunkowane molekularnie w raku jelita grubego

SESJA VII – Nowe terapie wybranych nowotworów w praktyce klinicznej

- Nowości w leczeniu systemowym przerzutowego, opornego na kastrację raka gruczołu krokowego

- Nowe możliwości terapii systemowej czerniaków

- Leki wpływające na metabolizm kostny

SESJA VIII – Efektywność kosztowa terapii onkologicznych

- Onkologia oparta na faktach
- Aspekty prawne
- Omówienie wytycznych HTA stosowanych przez Agencję Oceny Technologii Medycznych
- Problemy w ocenie onkologicznych technologii medycznych na przykładzie wybranych rekomendacji AOTM

Więcej informacji oraz zapisy: <http://www.konferencje-medyczne.pl/onkologia-teoria-i-praktyka.html?a=390/12>