

Hemaferéza – vysoce účinná technika v terapii nemocných

Z. Gašová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha, ředitel prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Souhrn: Technika hemaferézy již patří k běžně používaným postupům jak v transfuzním lékařství, tak v terapii nemocných. Umožňuje přípravu velkých dávek krevních složek pro transfuzi nebo snížení obsahu zmnožených krevních elementů v cirkulaci nemocného nebo patogeneticky aktivních komponent obsažených v plazmě. Podmínkou pro účinné provedení výkonu je přítomnost patogeneticky aktivní složky v plazmě, možnost snížení její hladiny za pomoci vhodné přístrojové techniky a ověření účinnosti výkonu. V ÚHKKT jsme se zabývali optimalizací technik pro separace autologních a alogenních PBPC, posouzením klinického a imunomodulačního účinku extrakorporální fotochemoterapie, bezpečností dárcovství PBPC po mobilizaci a separaci a vyhodnocením nežádoucích reakcí v průběhu 2 828 terapeutických výkonů. Optimalizovali jsme postupy pro autologní a alogenní separace PBPC. Zavedli jsme techniku velkoobjemových separací (LVL) PBPC u dárců a pacientů. Prokázali jsme, že LVL separace umožňují přípravu vyšších dávek CD34⁺ buněk ve srovnání se standardními separacemi PBPC jak u (i) dobře mobilizovaných dárců a u (ii) dobře mobilizovaných pacientů, tak i u (iii) pacientů s nedostatečným efektem mobilizace. U dárců a pacientů s dobrým efektem mobilizace bylo možné pomocí jedné velkoobjemové separace připravit dostatečnou dávku CD34⁺ buněk pro transplantaci. Vypracovali jsme indikační kritéria pro provádění velkoobjemových separací PBPC. Při sledování bezpečnosti darování PBPC jsme po více než 10letém období neprokázali v souboru 153 dárců žádnou závažnou komplikaci. Na našem pracovišti jsme zavedli „off line“ techniku extrakorporální fotochemoterapie (ECP) a sledovali její vliv na imunitní funkce a klinický stav u nemocných s chronickou GVHD a s kožními lymfomy z T-lymfocytů (CTCL). Extrakorporální fotochemoterapie příznivě ovlivnila průběh onemocnění u nemocných s c-GVHD a CTCL. V průběhu terapie nedošlo k významným změnám v parametrech hepatálních funkcí a v hodnotách IgG, urey, kreatininu a urikemie v séru. Nepozorovali jsme zvýšený výskyt infekcí ani jiné závažné komplikace. Extrakorporální fotochemoterapie je alternativní netoxický imunoterapeutický postup umožňující zlepšení kvality života nemocných při snížení rozsahu celkové nespecifické imunosuprese. Přestože jsou terapeutické hemaferézy považovány za velmi bezpečné výkony, lze se v jejich průběhu setkat i se závažnými komplikacemi. V průběhu 2 828 terapeutických hemaferéz jsme zachytili 330 (12 %) komplikací. Nejčastěji se vyskytly hypokalcemické reakce, porucha funkce žilního přístupu a hypotenze. Většina komplikací nebyla závažná, avšak ve 2 případech došlo k akutním, život ohrožujícím reakcím – ke krvácení a k septické reakci. Pro předcházení komplikací je proto zvláště u plánovaných výkonů důležitá vhodná příprava pacienta.

Klíčová slova: terapeutická hemaferéza – hemapheresis – výměnná plazmaferéza – výměnná erythrocytaferéza – leukocytaferéza – PBPC – imunoadsorpce – extrakorporální fotochemoterapie

Hemapheresis – the efficient therapeutic technique in clinical practice

Summary: Hemapheresis technique has been used widely in the clinical practice. It enables preparing high yields of blood components or helps to remove the pathogenetic substance from the patient's circulation. In the Institute of Hematology and Blood Transfusion many types of therapeutic methods have been used. Procedures include cell depletion – with removing of the extent of leukocytes, red cell and platelets from the patient's circulation. Other methods are therapeutic plasma exchange, red blood cells exchange, immunoabsorption of IgG, extracorporeal photochemotherapy (ECP), and peripheral blood progenitor cells (PBPC) collections. In our previous studies we have focused to optimization of the PBPC collection techniques in donors and in patients. The large volume leukapheresis technique was proved as more efficient than the standard collections, and would be preferred in all circumstances when donors or patients can tolerate it. "The off line" method of Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) was introduced in the therapy of patients with chronic GVHD (cGVHD) and cutaneous T cell lymphomas. We tried to evaluate the immunomodulatory and clinical effect of the "off line" ECP. The immature dendritic cells (DC's) were found in mononuclear cell concentrates in patients with cGVHD, and ECP was efficient in the therapy of patients with cGVHD and CTCL. The frequency and types of the adverse reactions associated with therapeutic hemapheresis were evaluated. The number of 330 reactions (12%) was observed in the course of 2,827 therapeutic procedures, including PBPC collections. Hypocalcemia, insufficient function of the venous access, and hypotension were the most frequent. The majority of reactions was mild to moderate, and reactions were treated efficiently. Only in two patients the acute, severe and life threatening reactions have occurred – bleeding in the placement of the central venous catheter and the septic reaction. Fortunately, the serious complications were managed successfully. Despite the adverse reactions, which can occur occasionally, hemapheresis technique is considered as a relatively safe therapeutic procedure. However, preapheresis evaluation of the clinical condition of the patients and identification "risky" patients would be useful.

Key words: therapeutic hemapheresis – hemapheresis – plasma exchange – red blood cell exchange – leukocytapheresis – PBPC – imunoabsorption – extracorporeal photochemotherapy

Úvod

Již v dávné minulosti se krvi přičítaly magické vlastnosti. Historické prameny uvádějí, že ve starověku se požití krve nebo koupele v krvi považovaly za léčebný prostředek, který pomáhal upevnit zdraví a vitalitu nemocných [1]. V pozdějších dobách se pouštění krve žilou stalo běžně používanou léčebnou metodou a také byly zaznamenány první pokusy o transfuzi krve – vesměs však s kontroverzním účinkem. Až ve 20. století došlo k významným objevům, které pomohly rozvoji transfuzního lékařství a umožnily, že se transfuzní terapie stala poměrně bezpečným léčebným postupem.

K významným objevům transfuzního lékařství patří:

- objev krevních skupin (Landsteiner 1900) [2];
- použití citrátu sodného jako anti-koagulační látky (Lewisohn, Hustin, Weil 1915) [1];
- objev citrátového a glukózového roztoku – ACD, který umožnil uchovávání odebrané krve až po dobu 21 dní (Loutit, Mollison 1943) [1];
- vývoj materiálů z plastických hmot, které se začaly používat k výrobě vaků pro transfuzní přípravky (Walter 1950) [1]. Předpokládalo se, že použití materiálů z plastů omezí poškození erytrocytů a proteinů, k němuž docházelo během odběrů krve do skleněných nádob;
- objev plastů typu polyolefinů, které propouštějí kyslík a oxid uhličitý, a vývoj funkčně uzavřených souprav vaků pro odběr krve. Vaky z plastů zcela nahradily původní odběry krve, které se prováděly pomocí otevřeného systému skleněných nádob. V systémech uzavřených vaků s integrovanými sterilními roztoky již bylo možné také krev zpracovávat na transfuzní přípravky a následně je uchovávat. Vaky z polyolefinových materiálů navíc umožnily významně prodloužit dobu uchovávání koncentrátů krevních destiček.

Dalším pokrokem bylo praktické využití techniky hemaferézy pomocí separátorů krevních elementů v 70. letech 20. století [3]. Hemaferetické postupy umožnily nejen přípravu vysokých dávek krevních komponent pro transfuzi, ale také provádění terapeutických extrakorporálních eliminačních výkonů.

Až do 60. let minulého století se krev odebírala od dárců do speciálních skleněných nádob. Systémy pro skladování krve byly funkčně otevřené, a proto bylo nezbytné věnovat velkou pozornost prevenci mikrobiální kontaminace krve. Přes tyto nesnadné postupy bylo darování krve a transfuze již tehdy velmi bezpečné. Možnosti dřívější techniky však byly omezené a v praxi se z odebrané krve dárců připravovaly pouze koncentráty erytrocytů (dále erytrocyty) a plazma. Separace dalších krevních komponent, jako např. koncentrátů trombocytů a granulocytů (dále trombocyty a granulocyty), byly velmi pracné, technicky náročné a málo účinné.

S vývojem polyolefinových materiálů, s příchodem vaků pro odběr a zpracování krve a s využitím moderní přístrojové techniky již bylo možné zavést přípravu dalších krevních elementů, jako trombocytů a granulocytů, z plné krve. Začaly se také používat účinnější hemaferetické postupy, pomocí kterých se z cirkulace dárce odebírá velká dávka předem stanovených krevních komponent, zatímco ostatní složky krve se vrací zpět do oběhu dárce.

Bezpečná, účinná a účelná hemoterapie je požadavkem dnešní doby. Předložená práce je příspěvkem k tomuto trendu a snaží se ukázat, že moderní separační techniky se významně podílely jak na vzniku racionálního přístupu k transfuzní terapii nemocných – na vzniku účelné hemoterapie, tak i na rozvoji nových, vysoce účinných léčebných postupů.

Práce je věnována několika hlavním tematickým okruhům: (i) dárcovským a terapeutickým hemaferézám, (ii) separačním technikám pro přípravu štěpů PBPC pro autologní a alogenní

transplantaci, (iii) extrakorporální fotochemoterapii, (iv) bezpečnosti terapeutických výkonů a (v) bezpečnosti darování krvetvorných buněk z periferní krve po mobilizaci a separaci.

První část práce „Separace krevních komponent technikou hemaferézy“ je věnovaná technice hemaferézy – zavedení a hodnocení nových, vysoce účinných separačních postupů v terapii nemocných.

Vzhledem k tomu, že výsledek transplantace krvetvorných buněk je ovlivněn také kvalitou podaného štěpu, soustředili jsme se nejprve na separační techniky pro přípravu krvetvorných buněk z krve (PBPC) dárců a pacientů. Zabývali jsme se hledáním optimálních postupů, které by umožnily sběr co nejvyšší dávky CD34⁺ buněk pro jejich autologní a alogenní transplantaci. Zavedli jsme techniky pro provádění standardních a velkoobjemových separací, hodnotili jejich účinnost a navrhli indikační kritéria pro provedení velkoobjemových separací PBPC.

V další části práce jsme ověřovali klinický a imunomodulační účinek metody extrakorporální fotochemoterapie (ECP), kterou jsme zavedli do terapie nemocných s chronickou GVHD a s kožními lymfomy z T-lymfocytů (CTCL/mycosis fungoides). Metodu jsme prováděli pomocí „off line“ režimu.

V souvislosti s potřebou bezpečného a účinného provádění dárcovských a terapeutických výkonů za pomoci techniky hemaferézy jsme hodnotili nežádoucí reakce, s nimiž jsme se setkali v průběhu 2 828 terapeutických výkonů v letech 2003–2007.

V průběhu více než 10 let jsme sledovali zdravotní stav dárců krvetvorných buněk po mobilizaci za pomoci rh-G-CSF a po separaci krvetvorných buněk z periferní krve. Cílem bylo ověření bezpečnosti dárcovství krvetvorných buněk minimálně po dobu 10 let.

Technika hemaferézy a separace krevních komponent

Hemaferéza je postup, který se provádí pomocí přístrojů – separátorů

krevních komponent. Během výkonu se nejprve odebírá krev ze žíly dárce nebo pacienta. Krev se dále mísí s antikoagulačním roztokem a vede do přístroje, v němž se rozdělí podle specifické hmotnosti na jednotlivé krevní složky. Odebírané komponenty krve se sbírají do zvláštního vaku a krev ochuzená o část těchto složek se vrací zpět do cirkulace dárce nebo pacienta. Ve srovnání se standardními odběry krve lze technikou hemaferézy připravit transfuzní přípravky s vysokým obsahem krevních složek.

Centrifugační separační postupy se začaly vyvíjet již v 19. století. První separátor zkonstruoval Carl Gustav Patrik de Laval v roce 1877 ve Švédsku [3]. Metoda se používala především v průmyslových aplikacích, např. v ropném průmyslu nebo k separaci izotopů uranu. V průběhu 2. světové války věnovaly USA značné úsilí přípravě velkých dávek krevních složek, které měly sloužit k terapii následků nemoci z ozáření. K využití centrifugačních postupů při přípravě krevních komponent došlo až v 2. polovině 20. století. V roce 1951 navrhl Edwin J. Cohn v USA „biomechanické zařízení“, pomocí kterého již bylo možné v průběhu darování krve provádět „on line“ separaci krevních komponent. Přístroj se podařilo zkonstruovat a uvést do praxe. Odebíraná krev dárce se mísila s antikoagulačním citrátovým roztokem, vstupovala do separátoru a centrifugovala se při 2 000 otáčkách za min. Vlivem gravitace došlo k separaci krve na jednotlivé složky s různou specifickou hmotností. Tyto krevní komponenty bylo možné použít pro transfuzní terapii.

Technika hemaferézy našla své uplatnění nejen v produkci transfuzních přípravků, ale také v terapii nemocných. V roce 1964 vyvinul George Judson v USA přístroj pro terapeutickou leukocytaferézu, pomocí které bylo možné snížit zmnožený obsah leukocytů v krvi u nemocných s leukemií [3].

Postupně docházelo ke zdokonalení separačního systému, ke zvýšení jeho bezpečnosti, k zajištění sterility v se-

paračním okruhu a k rozšíření typů výkonů. Technika hemaferézy získala své významné postavení jak v dárcovských aplikacích při přípravě transfuzních přípravků, štěpů krvetvorných buněk z periferní krve (Peripheral Blood Progenitor Cells – PBPC) a mononukleárních buněk, tak i v terapii nemocných [4–9].

Technika hemaferézy se provádí za pomoci separátorů krevních komponent, které obvykle pracují na centrifugačním principu. Krevní komponenty lze však také připravit pomocí techniky membránové filtrace. V některých indikacích se využívá kombinovaný účinek centrifugace s filtrací nebo centrifugace (případně filtrace) s extrakorporální imunoadsorbencí [6].

Při technice membránové filtrace se krev separuje na jednotlivé komponenty na membránách z celulozodiacetátů, polykarbonátů, polysulfonů, polypropylenu nebo polyvinylchloridu. Technika membránové filtrace se nejčastěji využívá k separaci plazmy. Filtrační přístroje jsou poměrně jednoduché a obvykle mají nízký extrakorporální objem. Určitou nevýhodou je možnost poškození erytrocytů při kontaktu s filtrem nebo aktivace některých složek komplementu s následnou leukopenií.

Centrifugační separátory krevních elementů a plazmy pracují v (i) intermitentním (diskontinuálním) nebo (ii) v kontinuálním režimu.

Intermitentní přístroje využívají jednožilního přístupu, při němž se krev odebírá z jedné žíly dárce nebo pacienta. V přístroji se separuje příslušná komponenta a stejnou žílou se krev ochuzená o separovanou složku vrací zpět do cirkulace dárce nebo pacienta. V intermitentním režimu se opakují cykly odběru a návratu krve stejnou cestou do té doby, dokud se neodebere požadované množství komponenty. Přístroje uvedeného typu mají většinou malé rozměry a lze je snadno přemístit mezi jednotlivými pracovišti. Intermitentní technika zatěžuje cirkulaci výraznějšími objemovými fluktuacemi.

Kontinuální separátory pracují s využitím dvoužilního přístupu, kdy se z jedné žíly odebírá plná krev, z níž se separuje požadovaná složka, a současně se druhou žílou vrací do cirkulace krev ochuzená o tuto separovanou komponentu. Ve srovnání s předchozím typem separátorů mají kontinuální přístroje obvykle menší extrakorporální objem a vykazují menší objemové fluktuace. Jsou vhodné jak pro dárcovské, tak i pro léčebné separace. Jsou však robustní a relativně hůře mobilní.

U některých typů centrifugačních separátorů lze v průběhu dárcovské trombocytaferézy provádět deleukotizaci trombocytů, např. systémem Cobe Spectra, Gambro/Caridian/Terumo. Proces nemá vliv na zkrácení doby expirace přípravku a na rozdíl od filtračních deleukotizačních technik při něm nedochází k ztrátám trombocytů. Deleukotizované transfuzní přípravky mají nižší obsah přimísených leukocytů než 1×10^6 a podávají se nemocným k prevenci aloimunizace, febrilních nehemolytických potransfuzních reakcí a přenosu CMV infekce [3,10].

Hemaferetické techniky mají v ÚHKT tradici již od konce 80. let 20. století. Původně se prováděly pouze dárcovské trombocytaferézy a terapeutické plazmaferézy. Pracoviště se postupně specializovalo na zavedení nových separačních technik a na rozšíření spektra výkonů. Vedle dárcovských separací trombocytových koncentrátů jsme zavedli separace granulocytů, lymfocytů pro DLI (Donor Lymphocyte Infusion), alogenních a autologních krvetvorných buněk z periferní krve – PBPC (Peripheral Blood Progenitor Cells). Zavedli jsme další léčebné výkony, k nimž patří:

- depleční separace – erytrocytaferéza, trombocytaferéza, leukocytaferéza;
- výměnné výkony – výměnná plazmaferéza a výměnná erytrocytaferéza;
- extrakorporální fotochemoterapie a
- extrakorporální imunoadsorbence.

Původní celkový počet dárcovských a terapeutických hemaferéz se postupně zvýšil z 200 výkonů za rok na současných asi 2 000 výkonů za rok [6,10].

Dárcovské hemaferézy – monokomponentní a multikomponentní separace transfuzních přípravků za pomoci techniky hemaferézy [3,4]

Hemaferetické postupy získávaly své významné místo v transfuzním lékařství od 70. let minulého století [3]. Jak již bylo uvedeno, lze technikou hemaferézy připravit transfuzní přípravky s vyšším obsahem krevních komponent nebo ve větším objemu ve srovnání se standardními odběry krve. Nejčastěji se provádějí trombocytaferézy, plazmaferézy, erytrocytaferézy, granulocytaferézy, separace lymfocytů pro DLI, separace mononukleárních buněk (MNC) pro extrakorporální fotochemoterapii a příprava štěpů krvetvorných buněk z periferní krve – PBPC – od dárců a pacientů.

Technika hemaferézy umožňuje připravit jednoduché, dvojité i trojitě „jumbo“ dávky plazmy a trombocytů a dvojité dávky erytrocytů. Během jednoho odběru lze navíc získat různé kombinace velkých dávek krevních komponent, tzv. multikomponentní odběry transfuzních přípravků. Technika multikomponentních odběrů je relativně novým postupem. Její vznik umožnila stále se vyvíjející separační technologie, např. přístroje typu Amicus (Fenwall) nebo Trima Accel (Gambro BCT/Caridian/Terumo). Pomocí těchto typů separátorů lze obvykle provést jen dárcovské odběry a nelze je již využít pro terapeutické aplikace. Právě pro toto jejich specializované zaměření je separační proces velmi účinný a rychlý [4].

Nejčastěji se připravují dvojkombinace plazmy a trombocytů, méně často plazmy a erytrocytů, případně i trojkombinace plazmy, trombocytů a erytrocytů.

Je již samozřejmostí, že moderní vybavení využívají také „in line“ časné de-leukotizační technologie (buď centrfu-

gační, nebo filtrační), takže koncentráty krevních elementů jsou časné a účinně zbavené příměsí leukocytů. Jejich kvalita je i z těchto důvodů velmi vysoká.

Trombocyty připravené technikou hemaferézy jsou ve srovnání s přípravky ze standardních odběrů plně krve více konzistentní, lze je lépe kvalitativně a kvantitativně definovat a jsou účinné v terapii nemocných. Příjemci transfuzí dostávají přípravky od menšího počtu dárců.

V průběhu přístrojových monokomponentních a vícekomponentních separací lze dárcům podat infuze roztoků a provést objemovou substituci odebraných elementů. Tím se snižuje riziko nežádoucích reakcí z objemové deplece. Dárci tolerují odběry velmi dobře a některé studie udávají dokonce nižší celkový počet nežádoucích reakcí a nižší výskyt závažných reakcí ve srovnání s odběry plné krve [3].

Při zařazování dárců do registru pro přístrojové odběry je nutné respektovat doporučení pro bezpečné darování krve a krevních složek [1]. Kritéria pro výběr dárců pro přístrojové odběry jsou náročnější než u dárců plné krve a ne každý zájemce o tento typ odběrů vyhovuje. Proto ani v současné době ani v budoucnosti nelze počítat s tím, že by se dárci krve přeměrovali výhradně na přístrojové odběry. I přesto, že multikomponentní darování krevních komponent pomáhá úspěšně vyřešit některé závažné problémy klinické a transfuzní medicíny, je třeba i nadále podporovat také standardní dárcovské odběry. Oba typy dárcovských odběrů by se měly vyvíjet vedle sebe, doplňovat se a spolupracovat jak v urgentních situacích, tak i při řešení běžných potřeb denní praxe.

Terapeutické hemaferézy – terapeutické eliminační techniky využívající centrifugačního principu [3,11–18]

Terapeutické hemaferézy jsou léčebné extrakorporální výkony, jejichž cílem je snížit:

- obsah zmnožených krevních elementů v cirkulaci nemocného nebo

- obsah patogeneticky aktivních komponent obsažených v plazmě.

Odebrané složky se nahrazují roztoky krystaloidů, koloidů, plazmou nebo krevními složkami od zdravých dárců. Krevní složky se separují centrifugací podle své specifické hmotnosti. K zajištění žilního vstupu se přednostně využívají periferní žíly. Nelze-li zajistit funkční periferní žilní přístup, je třeba u nemocných zavést centrální žilní katétr. Nejčastěji se centrální katetry zavádějí do v. jugularis interna, v. subclavia nebo v. femoralis. U nemocných léčených dlouhodobě za pomoci opakovaných výkonů je vhodné založit arteriovenózní shunt.

Terapeutické hemaferézy jsou výkony, které nemohou ovlivnit příčinu onemocnění.

Jsou však schopné upravit klinický stav nemocného, zlepšit kvalitu jeho života a oddálit závažné komplikace základního onemocnění. Uplatňují se v léčbě hematologických, nefrologických, neurologických, onkologických, metabolických a revmatologických onemocnění.

Přestože hemaferetické výkony patří k velmi bezpečným postupům, mohou se v jejich průběhu vyskytnout i závažné nežádoucí reakce. Proto se terapeutické výkony mají indikovat racionálně s objektivním posouzením očekávaného přínosu terapie a s jeho porovnáním s možnými riziky. Je vhodné využívat poznatků medicíny založené na důkazech. ASFA (American Society for Apheresis) publikovala v roce 2010 doporučení pro provádění terapeutických hemaferéz v návaznosti na prokázané patofyziologické mechanismy u různých onemocnění. Doporučení se vztahují nejen k indikacím, ale i k rozsahu a frekvenci výkonů a kritériím pro zahájení a ukončení výkonů.

Terapeutické hemaferézy lze rozdělit do několika skupin [3,6–11]:

- Depleční výkony**, u nichž se z cirkulace nemocných odstraňují zmnožené složky krve, např. leukocyty, erytrocyty a trombocyty. Objem

odebrané složky obvykle nepřevyšuje 1 000 ml. Odebraný objem lze dle potřeby nahradit vhodnými roztoky krystaloidů nebo koloidů.

b) **Výměnné výkony** s výměnou plazmy nebo s výměnou erytrocytů. V průběhu výkonů se odebírají velké objemy plazmy (1–2násobky plazmového objemu) nebo velké objemy erytrocytů (1–2násobky celkového objemu erytrocytů). Odebraný objem je nutné nahradit vhodnými náhradními roztoky – plazmou, albuminem, koloidními roztoky nebo erytrocyty.

c) **Postupy, při nichž se separují mononukleární buněčné frakce** pro léčebné využití. Přípravují se:

- **přípravky pro transplantaci a hemopoetickou rekonstituci**, jako jsou krvetvorné buňky z periferní krve (Peripheral Blood Progenitor Cells – PBPC);
- **přípravky pro imunomodulaci a genovou terapii**, např. alogenní přípravky pro adoptivní imunoterapii – infuze mononukleárních buněk k vyvolání graft vs leukemia efektu nebo autologní přípravky pro extrakorporální fotochemoterapii (Extracorporeal Photochemotherapy – ECP).

d) **Terapeutické hemaferézy v pediatrii** [3].

Depleční výkony

Leukocytaferéza

Požadavek na výkon je zpravidla urgentní a leukocytaferéza se provádí v situacích, kdy je třeba rychle snížit počet leukocytů v cirkulaci nemocného [8–11]. Výkon se indikuje u hyperleukocytárních nemocných s akutní myeloidní leukemií (AML), s akutní lymfoblastickou leukemií (ALL) a s chronickou myeloidní leukemií (CML).

U nemocných se vzestupem počtu cirkulujících leukocytů nebo leukemických blastů k hodnotám vyšším než $100 \times 10^9/l$ se může vyvinout syndrom hyperviskozity a syndrom leukostázy, při nichž dochází k projevům orgánové dysfunkce. Vytvářejí se mikrovasku-

lární leukoagregáty, dochází k rozvoji hyperviskozity, tkáňové ischemie, infarktů a krvácivých komplikací. V souvislosti s hyperleukocytózou se mohou vyvíjet také poruchy centrálního nervového systému. Klinická manifestace obtíží nemusí být v přímé souvislosti se samotným stupněm hyperleukocytózy. Frekvence a závažnost zvláště plicních komplikací z leukostázy je vyšší u monoblasticko-monocytárních subtypů AML (M4 nebo M5). V těchto případech byly popsány plicní komplikace již při relativně „nízkých“ počtech leukocytů $\leq 50 \times 10^9/l$.

Terapeutická leukocytaferéza se indikuje u **symptomatických** nemocných s počtem leukocytů vyšším než $100 \times 10^9/l$, u nichž dochází k projevům leukostázy a/nebo hyperviskozity krve. Výkony se provádějí opakovaně do poklesu počtu leukocytů k hodnotám $50 \times 10^9/l$.

Profylaktická leukocytaferéza se indikuje u **asymptomatických** pacientů s hyperleukocytózou vyšší než $100 \times 10^9/l$. V těchto situacích se výkon provádí preventivně vzhledem k obtížně předvídatelným komplikacím, které mohou vzniknout v souvislosti s rozvojem leukostázy. Výkon by neměl vést k odkládání indukční chemoterapie. Profylaktická leukocytaferéza se také indikuje u dětí s ALL s vyšším počtem leukocytů než $400 \times 10^9/l$.

V průběhu jednoho výkonu se zpracovávají 1,5–2násobky objemu krve nemocného a lze očekávat 30–60% pokles počtu leukocytů. Na účinnost leukocytaferézy má vliv rychlost produkce krevních komponent u nemocného. Dle potřeby lze provést substituci odebraného objemu krevních složek roztoky krystaloidů, koloidů nebo plazmou [11].

Erytrocytaferéza

Erytrocytaferéza pomáhá snížit zmulžený obsah erytrocytů u primární polycytemie (PV) a u sekundární erytrocytózy. Též představuje účinný postup při snížení nadbytku železa v organismu u stavů s chronickým přetížením žele-

zem, např. u hereditární hemochromatózy a sekundární hemosiderózy. Erytrocytaferéza je vhodná v situacích, kdy je třeba rychle odebrat z cirkulace nemocného větší obsah erytrocytů. Výkon je účinnější než terapeutická venepunkce a nedochází při něm ke ztrátám plazmatických proteinů, trombocytů a granulocytů.

Depleční erytrocytaferéza pomáhá snížit hodnoty hematokritu, upravit viskozitu krve, zvýšit průtok krve v mikrocirkulaci a zlepšit perfuzi tkání. Optimální oxygenace tkání snižuje uvolňování trombogenních faktorů [11].

Pacienti s PV mohou mít projevy hyperviskozity již při hodnotách hematokritu 0,50. Cílem erytrocytaferézy je u těchto nemocných snížení hematokritu na hodnoty nejméně 0,45.

U nemocných s plicní hypoxií se doporučuje snížení hematokritu k hodnotám 0,50–0,52.

U nemocných s kongenitální cyanotickou srdeční vadou je vhodné udržovat hematokrit v rozmezí 0,50–0,60.

Objem odebraných erytrocytů závisí na celkovém objemu krve nemocného, na vstupní hodnotě hemoglobinu a hematokritu pacienta a na požadované hodnotě hemoglobinu a hematokritu pacienta po výkonu. V průběhu separací lze použít substituční krystaloidní nebo koloidní roztoky [11].

Trombocytaferéza

Trombocytaferéza [11] se indikuje u nemocných s počtem trombocytů vyšším než $1\,500 \times 10^9/l$ k prevenci tromboembolických a krvácivých komplikací. Výkon se obvykle provádí u nemocných s obtížně ovlivnitelnou trombocytózou při myeloproliferativním onemocnění, při esenciální trombocytemii (ET), u nemocných s polycytemia vera (PV) a u nemocných se sekundární trombocytózou po splenektomii nebo v souvislosti s infekčním onemocněním.

Trombocytaferéza se provádí také u vysoce rizikových nemocných s ET nebo PV, u nichž je použití cytoredukčních látek kontraindikováno (gravidita) nebo u nichž je nástup účinku

farmakoterapie pomalý (např. před urgentním chirurgickým výkonem).

Za cílovou hodnotu počtu trombocytů lze obvykle považovat počty $600 \times 10^9/l$. V průběhu jednoho výkonu, kdy se zpracuje 1,5–2násobek objemu krve nemocného, lze očekávat 30–60% pokles počtu trombocytů. Dle potřeby lze provést substituci odebraného objemu krevních složek roztoky krystaloidů.

Výměnné výkony a imunoadsorpce [3,11]

U výměnných výkonů se z cirkulace nemocného odstraňují větší objemy plazmy nebo erytrocytů, přičemž se odebrané množství těchto složek nahrazuje roztoky krystaloidů a koloidů nebo plazmou, případně erytrocyty od zdravých dárců. Aplikace transfuzních přípravků v průběhu výměnných výkonů probíhá podle stejných postupů jako transfuzní terapie. Z výměnných výkonů mají největší klinický význam výměnná plazmaferéza a výměnná erytrocytaferéza.

Výměnná plazmaferéza [3,6]

Při výměnné plazmaferéze (Therapeutic Plasma Exchange – TPE) se z cirkulace nemocného odstraňuje plazma s obsahem autoimunních protilátek (IgG, event. IgM), aloprotilátek, cirkulujících imunokomplexů, multimerů von Willebrandova faktoru (ULWF – u TTP), paraproteinu (hyperviskózní syndrom, kryoglobulinémie) nebo inhibitorů koagulačních faktorů (f. VIII). Odebraná plazma se v průběhu výkonu nahrazuje roztoky krystaloidů, koloidů a plazmou. Při výměně jednoho objemu plazmy nemocného lze odstranit asi 60 % intravaskulární patogenní komponenty. Efekt TPE ovlivňuje nejen rozsah výkonu, ale i rychlost resyntézy patogenní složky a její redistribuce z extravaskulárního prostoru.

Výměnná plazmaferéza je výkon neselektivní, při němž se z cirkulace odebírá velký objem plazmy. Vedle patogenní komponenty se odstraňuje také fibrinogen, antitrombin, albumin,

imunoglobuliny, minerály a další látky. V průběhu výměnné plazmaferézy lze z cirkulace odstranit 1–2 g patogenní komponenty. Současně však dochází k nežádoucí eliminaci až 150 g dalších plazmatických proteinů [3]. Při eliminaci některých komponent z cirkulace, např. IgG nebo lipoproteinů, nebývá výměnná plazmaferéza dostatečně účinná (pozn.: IgG monomer má nízkou molekulovou hmotnost – 150 kD, snadno difunduje mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem a pouze 45 % IgG se nachází intravaskulárně. Naopak IgM pentamer má vysokou molekulovou hmotnost – 950 kD – a vyskytuje se ze 76 % intravaskulárně. Proto se při TPE odstraňují IgM účinněji než IgG) [3].

Mezi nejčastější indikace výměnné plazmaferézy patří trombotická trombocytopenická purpura (TTP), hemolyticko-uremický syndrom (HUS), kryoglobulinémie, mnohočetný myelom, myasthenia gravis, polyradikulo-neuritis Guillain-Barre a Goodpastureův syndrom.

- U myasthenia gravis se odstraňují autoimunní protilátky proti acetylcholinovému receptoru,
- U Goodpastureova syndromu se snižuje hladina protilátek proti bazální membráně glomerulů a
- U TTP se snižuje obsah multimerů von Willebrandova faktoru (ULWF) a hladina autoimunitních protilátek proti ADAMTS 13.

U onemocnění TTP se dle doporučení ASFA mají výměnné plazmaferézy provádět v denním režimu až do vzestupu počtu trombocytů k fyziologickým hodnotám a do jejich stabilizace. Dále se doporučuje sledování klinického stavu pacienta, hladin LDH v séru a počtu schistocytů [11].

Výměnná erytrocytaferéza

Při výměnné erytrocytaferéze se z oběhu nemocných odstraní větší množství erytrocytů, které se nahrazují erytrocyty od zdravých dárců. Výkon je účinný u nemocných se srpkovitou ané-

mií a malárií. Výkony lze indikovat v urgentním režimu nebo chronicky jako udržovací terapii. V akutních indikacích se erytrocytaferéza provádí u nemocných se srpkovitou anémií v krizi.

Cílem je snížit počet původních srpkovitých erytrocytů na 25–30 %, což odpovídá snížení hladiny hemoglobinu S (HbS) na 20–30 %. Obvykle postačí provedení jednoho výkonu.

U chronické terapie se výkony provádějí opakovaně tak, aby se hladina HbS pohybovala od 30 % do 50 %.

V průběhu jednoho výkonu se zpracují 1–2 objemy krve nemocného. U nemocných se srpkovitou anémií je vhodné k prevenci komplikací z hyperviskozity udržovat cílový hematokrit pacienta v rozmezí 30 ± 3 %. K substituci odebraných erytrocytů se podávají erytrocyty HbS negativní, deleukotizované a u imunosuprimovaných pacientů ozářené ionizujícím zářením (prevence potransfuzní reakce štěpu proti hostiteli – TA-GvHD). Doporučuje se podat erytrocyty vyrobené do 7 dnů po odběru. U těchto přípravků je nižší riziko hemolýzy v průběhu separace. Relativně „čerstvé“ erytrocyty obsahují vyšší hladiny 2,3-difosfoglycerátu (DPG), hemoglobin má nižší afinitu ke kyslíku a kyslík se snáze uvolňuje v tkáních [11].

Imunoadsorpční postupy [3,11]

Využití imunoadsorpčních postupů je vhodné v situacích, kdy se centrifugačními postupy nedaří snížit obsah nežádoucích komponent v cirkulaci. Imunoadsorpční postupy se využívají k oddělení jednotlivých frakcí plazmy, nebo dokonce selektivně k oddělení určitého typu patogenní komponenty, např. imunoglobulinů a lipoproteinů. Mezi látky s účinnou adsorpční schopností patří např. rekombinantní stafylokokový protein A nebo ovčí protilátky proti lidským imunoglobulinům.

Při imunoadsorpci se nejprve za pomoci techniky hemaferézy (centrifugací nebo filtrací) separuje z cirkulace pacienta plazma. Plazma následně prochází adsorpční kolonou, kde do-

cháží k oddělení patogenní komponenty, která zůstává vázaná na koloně. Ošetřená plazma se poté vrací zpět do oběhu nemocného. Těmito postupy lze odstranit z cirkulace až asi 80–90 % cílových látek. Na rozdíl od výměnné plazmaferézy je imunoadsorpce účinnější a navíc není zapotřebí provádět substituci ošetřené plazmy náhradními roztoky nebo plazmou od zdravých dárců.

Imunoadsorpce se indikuje v terapii nemocných:

- s autoimunitními onemocněními refrakterními na standardní léčbu (včetně léčby imunosupresivy a plazmaferézami), např. u nemocných s refrakterními formami myastenia gravis;
- u těžkých familiárních hyperlipoproteinemií. Je jedinou možností léčby familiární hypercholesterolemie u pacientů, kteří neodpovídají na dietní, režimovou a farmakologickou léčbu;
- imunoadsorpce se v posledních letech také zavádí do terapie u pacientů s dilatační kardiomyopatií se sníženou ejekční frakcí levé komory a se symptomy srdečního selhávání NYHA III, kteří jsou léčeni maximálními dávkami terapie.

Separace mononukleárních buněčných frakcí pro léčebné využití [3,12–31]

Ve skupině terapeutických hemaferéz se nacházejí další postupy, při nichž se připravují mononukleární buněčné frakce pro léčebné využití [3]. Jsou to přípravky určené pro:

- transplantaci a hemopoetickou rekonstituci (PBPC) a
- imunomodulaci a genovou terapii.

Přípravky pro transplantaci a hemopoetickou rekonstituci [3,19,20–24,29–31]
Krvetvorné buňky z periferní krve, PBPC (Peripheral Blood Progenitor Cells)
 PBPC jsou krvetvorné buňky, které se u dárců a u nemocných vyplaví po předchozí mobilizační přípravě z kostní

dřeně do krve. Z krve je lze sbírat za pomoci techniky hemaferézy.

U nemocných po vysokodávkované chemoterapii jsou PBPC schopné zajistit obnovu hemopoetických a imunitních funkcí. Na svém povrchu exprimují glykoprotein CD34, který lze detekovat pomocí metody průtokové cytometrie. Doba přihojení krvetvorných buněk po transplantaci se definuje jako vzestup počtu neutrofilních leukocytů nad hodnotu $0,5 \times 10^9/l$ nebo trombocytů nad 20, resp. $50 \times 10^9/l$. K přihojení dochází obvykle mezi 12.–14. dnem po převodu. Tato doba je významně kratší ve srovnání s dobou přihojení krvetvorných buněk z kostní dřeně, k níž dochází v intervalu 20–30 dnů.

PBPC se připravují technikou leukocytaferézy jak od zdravých dárců, kteří je darují pro nemocné (PBPC pro alogenní transplantaci), tak i od nemocných, kdy nemocný daruje krvetvorné buňky pro svoji terapii (PBPC pro autologní transplantaci).

Autologní PBPC se připravují pro terapii pacientů s hematologickými maligními onemocněními nebo s autoimunitními onemocněními.

Alogenní PBPC se připravují pro terapii pacientů s hematologickými maligními onemocněními, se selháním funkce kostní dřeně, s imunodeficitními syndromy a s vrozenými metabolickými poruchami.

Mobilizace CD34⁺ buněk z kostní dřeně do krve [3,27]

Za běžných podmínek se nachází v krvi jen velmi malé množství krvetvorných buněk. Toto množství buněk nemůže zajistit obnovu krvetvorných a imunitních funkcí nemocného. Proto se před sběrem PBPC u dárců a u nemocných provádí mobilizace krvetvorných buněk z kostní dřeně do periferní krve. Pro mobilizaci buněk má význam chemokinový receptor CXCR4, který je specifický pro SDF-1 α (stromal derived factor-1 α). Interakce mezi SDF-1 α a CXCR4 je významná pro přítomnost krvetvorných buněk v kostní dřeni.

Pacientům v mobilizační přípravě se obvykle podává kombinace chemoterapie a růstových faktorů (např. rh-G-CSF, který degraduje SDF-1 α) na uvolnění krvetvorných buněk z kostní dřeně do krve. U těžce předléčených pacientů, u nichž ani po podání růstových faktorů nedochází k vyplavení dostatečného množství krvetvorných buněk do krve, se mohou podat účinnější mobilizační přípravky, jako např. inhibitory receptoru CXCR4 (Plerixafor).

Dárci se mobilizují pouze pomocí růstových faktorů, inhibitoru receptoru CXCR4 (Plerixafor) nebo jiných přípravků. Chemoterapie se dárcům nepodává. Účinnost mobilizace se posuzuje podle hladiny CD34⁺ buněk v krvi, které se vyšetřují pomocí techniky průtokové cytometrie. Hodnoty vyšší než $20 \times 10^3/ml$ se považují za projev úspěšné mobilizace (jak u pacientů, tak u dárců) a také za ukazatel pro zahájení sběru buněk. Cílem separačních postupů je příprava terapeutické dávky CD34⁺ buněk pro transplantaci v hodnotě minimálně $2,5 \times 10^6/kg$. V některých indikacích se připravuje i vyšší dávka CD34⁺ buněk, např. $5–8 \times 10^6/kg$.

Efekt mobilizace je krátkodobý, variabilní a obtížně předvídatelný. Někdy se mobilizace nezdaří, z kostní dřeně se vyplaví jen malé množství krvetvorných buněk a separační technikou nelze získat jejich potřebnou dávku. Uvádí se, že asi u 5 % zdravých dárců dochází k selhání mobilizace krvetvorných buněk z kostní dřeně do krve. U nemocných, u nichž je účinnost mobilizace navíc ovlivněna základem onemocněním a rozsahem předchozí chemoterapie/aktinoterapie, dochází k selhání mobilizace častěji, až ve 30 % případů.

Separací techniky pro přípravu krvetvorných buněk z periferní krve [19–21,23,30–31]

Separace PBPC se provádějí:

- a) ve standardním režimu, při němž se zpracovávají 2–3 celkové objemy krve nemocného nebo

b) ve velkoobjemovém režimu, kdy se zpracovávají více než 3 objemy krve nemocného.

Výkony se liší nejen rozsahem, ale i antikoagulačními postupy a průtokovými rychlostmi. Velkoobjemové výkony umožňují získat vyšší dávky CD34⁺ buněk než standardní výkony jak u dárců, tak u pacientů. U dobře mobilizovaných pacientů a dárců lze pomocí 1 až 2 výkonů připravit potřebné množství CD34⁺ buněk pro transplantaci v dávce nejméně 5×10^6 /kg. Doba jednoho výkonu se pohybuje od 3 do 5 hod.

Standardní a velkoobjemové separace patří k technicky nejnáročnějším hemaferetickým postupům. V jejich průběhu se zpracovávají velké objemy krve a podávají se vyšší dávky antikoagulačních roztoků než u ostatních výkonů. Antikoagulační přípravky působí buď převážně v extrakorporálním okruhu (ACD-A), nebo mají systémový účinek (heparin). V průběhu výkonů může nastat významný pokles v parametrech krevního obrazu a v koagulačních testech a dochází k změnám v hladinách minerálů v séru.

Přípravky pro imunomodulaci a genovou terapii [3]

Přípravky pro imunomodulaci se využívají pro adoptivní imunoterapii, např. pro infuze alogenních mononukleárních buněk k vyvolání graft vs leukemia efektu, nebo se připravují v autologním režimu pro extrakorporální fotochemoterapii.

Alogenní přípravky pro adoptivní imunoterapii

Alogenní přípravky pro adoptivní imunoterapii – infuze mononukleárních buněk k vyvolání graft vs leukemia efektu. Do této skupiny patří příprava mononukleárních buněk – lymfocytů a monocytů (MNC) pro DLI (Donor Lymphocyte Infusion).

Mononukleární buňky se separují od zdravého dárce, který v předchozím období daroval nemocnému kr-

vetvorné buňky (PBPC) pro alogenní transplantaci. V případě, že se u pacienta po transplantaci vyvíjí relaps základního onemocnění, daruje stejný dárce mononukleární buňky, které jsou schopné indukovat reakci štěpu proti leukemii a potlačit relaps onemocnění (GVL – graft vs leukemia).

U dárců MNC se před vlastním sběrem již neprovádí mobilizace buněk. V průběhu výkonu se zpracovává 1–2násobek krevního objemu dárce. Cílem je příprava koncentráту s obsahem CD3⁺ T-lymfocytů, obvykle v rozmezí 1×10^7 až 5×10^8 /kg hmotnosti příjemce. Volba dávky závisí na základním onemocnění a stavu pacienta.

Autologní přípravky pro extrakorporální fotochemoterapii [3,12–16,26,28–29]

Extrakorporální fotochemoterapie (ECP, fotoferéza) je terapeutický postup, který ovlivňuje reaktivitu imunitního systému nemocného. Metoda se indikuje v terapii onemocnění, na jejichž patogenезi se podílí T-lymfocyty.

Provedení ECP spočívá v několika krocích [28]:

- separace mononukleárních buněk (MNC) z cirkulace nemocného technikou hemaferézy. V průběhu výkonu se obvykle zpracovává 1,5–2násobek objemu krve nemocných;
- fotomodifikace mononukleárních buněk – k mononukleárním buňkám se extrakorporálně přidá fotosenzitivní látka 8-metoxypsoralen (8-MOP) v koncentraci 200 ng/ml. Takto upravené buňky se následně ozáří UV-A zářením v dávce 2 J/cm^2 ;
- aplikace mononukleárních buněk jako autologní transfuze zpět do cirkulace nemocného.

8-MOP patří do skupiny psoralenů, což jsou tricyklické aromatické sloučeniny, které se řadí mezi furokumariny a které vykazují výraznou absorpci UV-A záření. V buňkách se vážou na DNA struktury. Po ozáření UV-A se vytvářejí mezi bázemi molekuly DNA zkřížené vazby. Tyto změny mají za následek inhibici syntézy DNA a inhibici

proliferace buněk. Stupeň inhibice závisí na koncentraci psoralenu, vlnové délce a dávce UV-A záření.

Na účinku ECP se patrně podílí kombinace více procesů, např. indukce apoptózy lymfocytů, zvýšená produkce protizánětlivých cytokinů a diferenciace monocytů v dendritické buňky. Dendritické buňky mohou navodit buď imunotoleranci pacienta, nebo naopak specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám.

ECP je účinnou metodou v terapii chronické GVHD a v terapii kožních lymfomů z T-lymfocytů.

U nemocných s chronickou GVHD dochází k zlepšení klinického stavu a k ústupu postižení v kožní a hepatální lokalizaci. ECP se zdá být méně účinná v terapii akutní GVHD, i když byly publikovány práce popisující dobrou účinnost ECP i u některých forem akutní GVHD.

Možnosti ECP se ověřují v terapii roztroušené sklerózy, lupusu erythematosodes a rejekce štěpu po orgánových transplantacích srdce, ledvin a plic.

Extrakorporální fotochemoterapie se považuje za bezpečný imunoterapeutický postup, který ovlivňuje reaktivitu imunitního systému, avšak nevyvolává generalizovanou imunosupresi.

U nemocných léčených ECP nebyl prokázán zvýšený výskyt oportunních infekcí nebo maligních nádorových procesů.

Terapeutické hemaferézy u dětských pacientů [3,16]

Hemaferézy se u dětských pacientů považují za samostatnou skupinu výkonů jak pro technické rozdíly při provádění separací, tak i pro rozdílné projevy nežádoucích reakcí.

U dětských pacientů se používají stejné separační přístroje se stejným objemem extrakorporálního okruhu jako u dospělých pacientů. Pokud je extrakorporální objem separačního okruhu vyšší než 10–15 % celkového objemu krve pacienta nebo pokud má pacient nižší hmotnost než 25 kg, provádí se výkon odlišným postupem než u dospělých.

U dospělých pacientů se při přípravě výkonu vyplní extrakorporální okruh separačního systému sterilním fyziologickým roztokem. Po zahájení separace vstupuje antikoagulovaná krev pacienta do přístroje a fyziologický roztok se přemísť do zvláštního vaku. V této počáteční fázi se pacientům neaplikují infuze roztoků ani transfuzní přípravky. Nerovnováha mezi objemy odebraných a vrácených tekutin do cirkulace pacienta se upraví až v závěru výkonu doplněním tekutin. Velmi malé děti nebo hemodynamicky nestabilní pacienti nemusí tyto objemové změny tolerovat.

U malých dětí se proto příprava výkonů provádí za pomoci koncentráty erytrocytů. Při zahájení separace se krev odebírá nejprve z vaku s erytrocyty, zatímco odběr krve z cirkulace pacienta se zahájí až po naplnění separační soupravy „dárčovskými“ erytrocyty. V této fázi se do cirkulace pacienta vracejí erytrocyty, které prošly přístrojem.

Dárčovské erytrocyty nemají být starší 7 dní. U čerstvých erytrocytů je nízké riziko hemolýzy při separaci. Relativně „čerstvé“ erytrocyty obsahují vyšší hladiny 2,3-difosfoglycerátu (DPG) a hemoglobin má nižší afinitu ke kyslíku, což má za následek, že kyslík se snáze uvolňuje v tkáních. Erytrocyty se před podáním naředí sterilním fyziologickým roztokem na hodnoty hematokritu vyšší o 10–15 %, než je hematokrit pacienta. Erytrocyty se de-leukotizují a event. ozařují ionizujícím zářením. Při aplikaci erytrocytů v průběhu separace se dodržují stejné postupy jako při transfuzi erytrocytů. Je třeba také zvolit vyhovující žilní přístup, vhodný antikoagulační režim a zajistit monitorování vitálních funkcí během výkonu.

U dětských pacientů se nežádoucí reakce v průběhu výkonů mohou projevovat odlišnými příznaky než u dospělých. Zatímco u dospělých pacientů se např. známky citrátové toxicity mohou manifestovat cirkumorálními paresteziemi, křečemi nebo vzácně kardiální

arytmií, u dětí se projevují akutními bolestmi břicha, zvracením, bledostí, tachykardií a hypotenzí.

Počty terapeutických pediatrických hemaferéz celosvětově stoupají. Nejčastějšími výkony jsou depleční výkony, především leukocytaferéza u hyperleukocytárních pacientů, výměnná erythrocytaferéza u pacientů se srpkovitou anémií, výměnná plazmaferéza a separace PBPC. Hemaferézy se v pediatrii využívají v omezené míře především proto, že doposud neexistují všeobecně přijatá doporučení pro výkony u dětských pacientů. Rozhodnutí k terapii u dětí se zakládá především na klinických zkušenostech s dospělými pacienty [3].

Bezpečnost terapeutických hemaferéz [3,16–18]

Přestože se terapeutické hemaferézy považují za bezpečné výkony, mohou v jejich průběhu nastat závažnější nežádoucí reakce. Během separací dochází k přesunům tekutin mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem, ke změnám v hladinách minerálů v plazmě, ke změnám hladin koagulačních faktorů a imunoglobulinů.

Ve zvýšeném riziku nežádoucích reakcí se nacházejí pacienti:

- s poruchami kardiorepiračního systému s nestabilními vitálními funkcemi,
- v intenzivní péči,
- s anémií a s trombocytopenií,
- s krvácivými komplikacemi;
- léčení ACE inhibitory,
- s alergií,
- s potransfuzními reakcemi v anamnéze a
- gravidní pacientky [16].

Pacienti mohou být v bezvědomí (např. u TTP), na terapii kyslíkem nebo na ventilační podpoře. Mohou mít známky orgánového selhávání. V takových situacích je nutné zajistit v průběhu výkonu podporu vitálních funkcí a další intenzivní péči.

Během náročnějších výkonů, např. u velkoobjemových separací PBPC, mohou nastat významné změny v hla-

dinách minerálů v séru (pokles hladin K^+ , Mg^{++} , Ca^{++}) a také může dojít k výraznému ovlivnění parametrů koagulace a krevního obrazu. V průběhu výměnných terapeutických výkonů se pacientům podávají transfuze, které mohou být provázené potransfuzními reakcemi. Při výměnné plazmaferéze v terapii TTP a HUS se opakovaně transfundují velké objemy plazmy (plazma z plné krve, plazma z aferézy, kryosupernatantní plazma). Erytrocyty se podávají ve velkém množství a opakovaně při provádění výměnné erythrocytaferézy u pacientů s malárií nebo se srpkovitou anémií. Erytrocyty se též používají k předplnění přístroje při provádění terapeutické hemaferézy u dětí. Je vhodné, aby přípravky erytrocytů nebyly starší 7 dnů. Již dříve bylo uvedeno, že u relativně „čerstvých“ erytrocytů je nižší riziko hemolýzy a erytrocyty obsahují vysoké hladiny 2,3-DPG (nižší afinita Hb k O_2 a snadnější uvolnění O_2 v tkáních). V supernatantu čerstvých erytrocytů jsou nízké hladiny K^+ a kyseliny mléčné. Tato doporučení by se měla dodržovat zvláště při aplikaci erytrocytů u dětí v průběhu terapeutických hemaferéz. Postupy při aplikaci transfuzních přípravků v průběhu terapeutických hemaferéz se shodují se standardními postupy při podávání transfuzí.

U plánovaných výkonů je vhodné předem zajistit dostatečnou přípravu pacienta – ověřit, event. připravit vyhovující žilní přístup, zajistit minimální hodnoty krevního obrazu (hematokrit minimálně 21 % – vhodněji alespoň 24 %, trombocyty vyšší než $50 \times 10^9/l$), ověřit stav kardiorepiračního systému, renálních a hepatálních funkcí, mineralogram a parametry koagulačních vyšetření – aPTT a Quick, hladina fibrinogenu. Není vhodné, aby byl pacient v průběhu výkonů na souběžné terapii ACE inhibitory pro zvýšené riziko závažných hypotenzivně-anafylaktoidních reakcí (aktivace kalikrein-kininového systému a produkce bradykininu). U klinicky nestabilních nemocných se doporučuje mo-

nitorování vitálních funkcí. V průběhu výkonu jsou dárce i pacienti pod dohledem sestry a lékaře.

Nežádoucí reakce se obvykle vyskytují v rozmezí 3–25 % výkonů. Většina komplikací souvisí s nedostatečnou funkcí žilního přístupu nebo s klinicky nestabilním stavem pacienta. Vlastní separační proces vyvolává nežádoucí reakce v menším počtu případů, asi v 1–11 % výkonů. Reakce jsou většinou méně závažné a lze je úspěšně vyřešit v průběhu výkonu. Nicméně byly popsány i smrtelné komplikace – v důsledku krvácení, kardiopulmonálního selhání, syndromu TRALI nebo v souvislosti se vznikem těžké hypotenzivně-anafylaktoidní reakce u nemocných léčených ACE inhibitory [3,18].

V ÚHKT jsme hodnotili typy a frekvenci nežádoucích reakcí, k nimž došlo v průběhu 2 828 terapeutických výkonů, které jsme prováděli v období let 2003–2007. Celkem jsme zachytili 330 komplikací, což odpovídá 12 % ze všech výkonů. Nejvyšší frekvence komplikací byla zachycena u výměnné plazmaferézy, kterou lze se 128 komplikacemi z 330 považovat za nejrizikovější výkon. Nejčastějšími komplikacemi u výměnné plazmaferézy byla hypotenze, hypokalcemie a alergická reakce v souvislosti s transfuzí plazmy během výkonů. Dalšími výkony, u nichž se vyskytly četnější nežádoucí reakce, byly autologní separace PBPC, depleční leukocytaferézy a extrakorporální fotochemoterapie. V průběhu všech výkonů se nejčastěji vyskytly symptomy hypokalcemie, nedostatečná funkce žilního vstupu a hypotenzní reakce. Hypokalcemické reakce a hypotenze nebyly závažné a podařilo se je vyřešit ještě v průběhu separace. V zachyceném počtu 330 komplikací se však vyskytly také 2 závažné, život ohrožující komplikace – krvácení v oblasti centrálního žilního katétru, pravděpodobně v souvislosti s účinkem heparinu, a septická reakce. První komplikace nastala v průběhu autologní separace PBPC. K septické reakci došlo během autologní separace mononukleárních buněk

pro ECP v důsledku infikovaného centrálního žilního katétru. Za těchto okolností došlo k předčasnému ukončení obou výkonů, avšak obě tyto nejzávažnější komplikace se u pacientů podařilo zvládnout.

V roce 2000 jsme ve spolupráci s Českým registrem dárců krvetvorných buněk zahájili projekt Bezpečnost darování krvetvorných buněk z periferní krve. Sledovali a hodnotili jsme zdravotní stav dárců po ukončené mobilizaci (za pomoci rh-G-CSF) a po ukončení separací.

V sledovaném souboru byli zahrnuti jak příbuzní dárce, tak i nepříbuzní dárce, kteří byli vybráni Českým registrem dárců krvetvorných buněk. Hodnotili jsme celkový zdravotní stav dárců, parametry krevního obrazu a vybrané biochemické ukazatele v séru. Posuzovali jsme hodnoty urey, kreatininu, jaterních enzymů, LDH, celkového proteinu a elektroforézy bílkovin v séru a bylo provedeno vyšetření močového sedimentu. Dárce byli zváni k pravidelným kontrolám. V průběhu 1. roku jsme zvali dárce k 1. kontrole do jednoho týdne po ukončení separací a dále jsme prováděli kontrolní vyšetření v 4., 8. a 12. měsíci. Pokud nebyly nalezeny patologické výsledky, byli dárce zváni v následujících letech ke kontrolám jednou za rok. Sledovali jsme celkem 153 dárců. V souboru bylo zastoupeno 93 mužů (61 %) a 60 žen (39 %). Medián věku byl 39 (6–74) let. Separace krvetvorných buněk z periferní krve se zahajovaly při hodnotě koncentrace CD34⁺ buněk v krvi vyšší než $20 \times 10^3/\text{ml}$ a prováděly se za pomoci standardních a velkoobjemových výkonů. Většina separací proběhla ve velkoobjemovém režimu. V průběhu obou typů separací jsme nepozorovali žádné závažné nežádoucí reakce, pouze u 26 dárců (17 %) došlo již po 1. separaci k významnému poklesu počtu trombocytů k hodnotám nižším než $100 \times 10^9/\text{l}$. Ve všech případech jsme připravili požadovanou transplantační dávku CD34⁺ buněk, nejméně $5 \times 10^6/\text{kg}$ hmotnosti

příjemce. Jednu separaci podstoupilo 42 % dárců, 2 separace 49 % a 3 separace 9 % dárců. V průběhu sledování jsme nezachytili závažné změny zdravotního stavu dárců. Nejčastěji jsme pozorovali změny v krevním obrazu krátce po separaci, tj. pokles počtu trombocytů a přetrvávající vyšší počty leukocytů. Změny byly krátkodobé se spontánní úpravou parametrů k fyziologickým hodnotám do 4 měsíců po ukončené mobilizaci a separaci. Mobilizaci a separaci u dárců PBPC lze na našem pracovišti považovat i po 10 letech sledování za účinné a bezpečné postupy, které neměly za následek vážné změny zdravotního stavu dárců.

Závěr

V Ústavu hematologie a krevní transfuze jsme rozšířili použití hemaferetických dárcovských a terapeutických výkonů.

Zavedli a optimalizovali jsme postupy pro autologní a alogenní separace PBPC [19–23,30,31]. Prokázali jsme, že předseparační koncentrace CD34⁺ buněk v krvi vyšší než $20 \times 10^3/\text{ml}$ je projevem úspěšné mobilizace dárce nebo pacienta a je optimální pro zahájení separací. Použití tohoto kritéria vedlo k upřesnění naší práce a k snížení počtu separací z původních 5 na 1–2 výkony u dárců a pacientů [19]. Vzhledem k lineární závislosti výtežku CD34⁺ buněk na předseparační koncentraci CD34⁺ buněk v krvi lze u dobře mobilizovaných dárců a pacientů použít předseparační koncentraci CD34⁺ buněk jako jednoduchý ukazatel pro odhad počtu CD34⁺ buněk ve štetpu [19].

Na našem pracovišti jsme vypracovali a zavedli techniku velkoobjemových separací (LVL) PBPC u dárců a pacientů [20,21,23]. Prokázali jsme, že LVL separace umožňují přípravu vyšších dávek CD34⁺ buněk ve srovnání se standardními separacemi PBPC jak u (i) dobře mobilizovaných dárců a u (ii) dobře mobilizovaných pacientů, tak i u (iii) pacientů s nedostatečným efektem mobilizace [23].

U dárců a pacientů s dobrým efektem mobilizace bylo možné pomocí jedné velkoobjemové separace připravit dostatečnou dávku CD34⁺ buněk pro transplantaci [23].

Vypracovali jsme indikační kritéria pro provádění velkoobjemových separací PBPC, která lze doporučit [23]:

- u všech dárců a pacientů, kteří jsou schopni tento typ výkonu tolerovat;
- u významně předlěčených pacientů s nedostatečným efektem mobilizace, kdy pomocí standardních separací nelze získat dostatečnou dávku CD34⁺ buněk pro transplantaci; použití LVL separací je jedinou možností, jak získat alespoň minimální dávku CD34⁺ buněk pro transplantaci;
- v situacích, kdy je nutné připravit mimořádně velkou dávku buněk, např. před plánovanou tandemovou transplantací kmenových krvetvorných buněk nebo u postupů, kdy se u následných manipulací se štěpem očekává významná ztráta kmenových krvetvorných buněk; LVL separace nebyly provázené zvýšeným výskytem nežádoucích reakcí [23].

Štěpy PBPC připravené jak v standardním, tak i ve velkoobjemovém režimu se u nemocných s hematologickými onemocněními přihojily v intervalu 10–12 dní po transplantaci [19,23].

Na našem pracovišti jsme vypracovali „off line“ techniku extrakorporální fotochemoterapie (ECP) a sledovali její vliv na imunitní funkce a klinický stav nemocných s chronickou GVHD a s kožními lymfomy z T-lymfocytů (CTCL/mycosis fungoides) [25–27]. Prokázali jsme, že extrakorporální fotochemoterapie navodila v koncentrátech mononukleárních buněk rychlou a masivní apoptózu lymfocytů [25,27]. V koncentrátech mononukleárních buněk jsme u nemocných s chronickou GVHD izolovali dendritické buňky, které měly fenotypické a funkční vlastnosti nezralých myeloidních dendritických buněk. Ve srovnání

s dendritickými buňkami, které nebyly ošetřené 8-MOP a UV-A, produkovaly ošetřené dendritické buňky významná množství IL-10, který působí jako inhibitor maturace dendritických buněk. Dendritické buňky účinně fagocytovaly apoptotické lymfocyty a neindukovaly proliferaci T-lymfocytů [25]. Předpokládáme, že nezralé dendritické buňky mohou fagocytovat apoptotické lymfocyty a prezentovat jejich antigeny imunitnímu systému hostitele. Nezralé dendritické buňky mohou aktivovat antigen specifické regulační T-lymfocyty, které jsou schopné potlačit imunitní reakci a indukovat vznik imunotolerance. Na imunomodulačním efektu ECP se tak pravděpodobně mohou podílet interakce mezi efektorovými T-lymfocyty a dendritickými buňkami. Navrhli jsme nový pohled na možný mechanismus účinku extrakorporální fotochemoterapie [25].

U nemocných s c-GVHD a CTCL extrakorporální fotochemoterapie příznivě ovlivnila průběh onemocnění [27]. V průběhu extrakorporální fotochemoterapie nedošlo k významným změnám v parametrech hepatálních funkcí a v hodnotách IgG, urey, kreatininu a urikemie v séru. Nepozorovali jsme zvýšený výskyt infekcí ani jiné závažné komplikace. Extrakorporální fotochemoterapie je alternativní netoxický imunoterapeutický postup umožňující zlepšení kvality života nemocných při snížení rozsahu celkové nespecifické imunosuprese. Vypracovali a ověřili jsme účinnost „off line“ extrakorporální fotochemoterapie a zavedli tuto metodu do terapie nemocných s chronickou extenzivní GVHD a s CTCL s mycosis fungoides [28].

V průběhu 2 828 terapeutických hemaferéz jsme zachytili 330 (12 %) komplikací. Nejčastějšími nežádoucími reakcemi byly hypokalcemické reakce, porucha funkce žilního přístupu a hypotenze. Většina komplikací byla méně závažných, avšak ve 2 případech došlo k akutním, život ohrožujícím reakcím v důsledku účinku heparinu a v důsledku infikovaného centrálního žil-

ního katétru. Obě závažné reakce se podařilo úspěšně vyřešit.

Při více než 10letém sledování bezpečnosti dárcovství krvetvorných buněk jsme v souboru 153 dárců neprokázali žádnou závažnou komplikaci po mobilizaci a separaci.

Poděkování

Studie byly podporované grantovými projekty IGA MZČR – projekty No. 2827-3 a NI/7542-3, 2002-2005 a Výzkumným záměrem MZČR 00 337 360 001.

Literatura

1. McCullough J. Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2005: 1–7, 77–100, 131–161.
2. Van Aken W, Genet B. Transfusion Medicine: European Course on Blood Transfusion. Paris: Centre National d'Enseignement a Distance 1994: 353–377.
3. McLeod BC, Price TH, Weinstein R. Apheresis: principles and practice. 2nd ed. Bethesda, MD: AABB Press 2003: 1–26, 49–62, 95–157.
4. Gašová Z. Od odběru plné krve k multikomponentnímu dárcovství. Vnitř Lék 2005; 51: 274–275.
5. Eder A. Evidence-based selection criteria to protect blood donors. J Clin Apher 2010; 25: 331–337.
6. Lachmannová J. Očišťovací metody krve. Praha: Grada Publishing 1999.
7. Grima KM. Therapeutic apheresis in hematological and oncological diseases. J Clin Apher 2000; 15: 28–52.
8. Okafor C, Ward DM, Mokrzycki MH et al. Introduction and Overview of Therapeutic Apheresis. J Clin Apher 2010; 25: 240–249.
9. Ward D. Conventional apheresis therapies: a review. J Clin Apher 2011; 26: 230–238.
10. Gašová Z. Terapeutické hemaferézy. Transfúze Hemat Dnes 2001; 3: 88–93.
11. Szczipiorski ZM, Winters JL, Bandarenko N et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice – evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. J Clin Apher 2010; 25: 83–177.
12. Marques MB, Schwartz J. Update on extracorporeal photopheresis in heart and lung transplantation. J Clin Apher 2011; 26: 146–151.
13. Ward D. Extracorporeal photopheresis: how, when, and why. J Clin Apher 2011; 26: 276–285.
14. Sanford KW, Balogun RA. Extracorporeal photopheresis: clinical use so far. J Clin Apher 2012; 27: 126–131.
15. Gašová Z. Fotochemoterapie extrakorporální. Plazmaferéza výměnná. Výkony depleční terapeutické. In: Horký K (ed.). Lékařské repertorium. Praha: Galén 2003: 158, 447, 680–681.
16. Lu Q, Nedelcu E, Ziman A et al. Standardized protocol to identify high-risk patients undergoing therapeutic apheresis procedures. J Clin Apher 2018; 23: 111–115.
17. Torloni AS, Lumadue J, Zubair A. Therapeutic apheresis: when things go wrong. J Clin Apher 2012; 27: 168–171.

18. Balogun RA, Abdel-Rahman EM. Selected questions and answers given by apheresis medicine experts at TAA 2010. *J Clin Apher* 2011; 26: 297–305.
19. Gasova Z, Marinov I, Hruha A et al. The efficiency of PBPC collections and the relationship to the precollection concentration of CD 34+ cells in blood. *Transfus Sci* 1999; 20: 181–188.
20. Gašová Z, Ludvíková Z, Kučerová I et al. Separace hemopoetických progenitorových buněk z periferní krve (PBPC) u pacientů s hematologickými malignitami. *Čas Lék Česk* 1999; 138: 369–373.
21. Gašová Z, Ludvíková Z, Böhmová M et al. Standardní versus velkoobjemové separace PBPC. *Transfuzie Hematol Dnes* 2000; 6: 11–17.
22. Polouckova A, Vodvarkova S, Kobylka P et al. Comparison of two different methods for CD 34+ selection and T cell depletion in peripheral blood stem cell grafts – our experiences with CellPro, E rosetting and CliniMACS technique. *Neoplasma* 2001; 48: 374–381.
23. Gasova Z, Marinov I, Vodvarkova S et al. PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients. *Transfus Apher Sci* 2005; 32: 167–176.
24. Trněný M, Vacková B, Pytlík R et al. Vysokodávkovaná terapie s autologní transplantací krvetvorných buněk u nemocných s Hodgkinovým lymfomem. Dlouhodobé sledování nemocných v jednom centru. *Čas Lék Česk* 2006; 145: 19–24.
25. Spisek R, Gasova Z, Bartunkova J. Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Transfusion* 2006; 46: 55–65.
26. Bartosova J, Kuzelova K, Pluskalova M et al. UVA-activated 8-methoxypsoralen (PUVA) causes G2/M cell cycle arrest in Karpas 299 T-lymphoma cells. *J Photochem Photobiol B* 2006; 85: 39–48.
27. Mohty M, Duarte RF, Croockewit S et al. The role of plerixafor in optimizing peripheral blood stem cell mobilization for autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2011; 25: 1–6.
28. Gasova Z, Spisek R, Dolezalova L et al. Extracorporeal photochemotherapy (ECP) in the treatment of patients with c-GVHD and CTCL. *Transfus Apher Sci* 2007; 36: 149–158.
29. Gašová Z. Hemoterapie, Terapeutické hemaferézy. In: Klener P (ed.). *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén 2006: 507–514.
30. Gasova Z, Bhuiyan-Ludvikova Z, Böhmova M et al. PBPC collections: management, techniques and risks. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 237–243.
31. Lysak D, Koristek Z, Gasova Z et al. Efficacy and safety of PBSC collection in elderly donors: does age interfere? *J Clin Apher* 2011; 26: 9–16.

doc. MUDr. Zdenka Gašová, CSc.

www.uhkt.cz

e-mail: zdenka.gasova@uhkt.cz

Doručeno do redakce: 21. 5. 2012