

Aktuální postupy při přípravě granulocytů z aferézy

Zdenka Gašová,

Zdeňka Bhuiyanová Ludvíková, Jana Hrušková, Klára Knappová

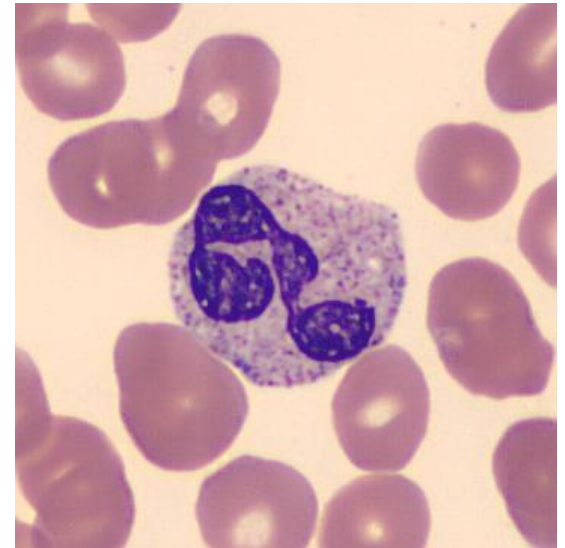
Ústav hematologie a krevní transfuze,
Praha

„15. Střešovický transfuzní den“

Praha, 23. listopad, 2022

Granulocyty – segmentované NT (PMN), eozinofily a basofily

- Primární - azurofilní granula
- Sekundární (neutrofilní, eosinofilní, basofilní)
- Neutrofilní leukocyty
 - Základní komponenta vrozené imunitní odpovědi
 - První linie obrany proti invazivním patogenům
 - 50 - 70% cirkulujících leukocytů



Granulocyty – Transfuzní přípravek

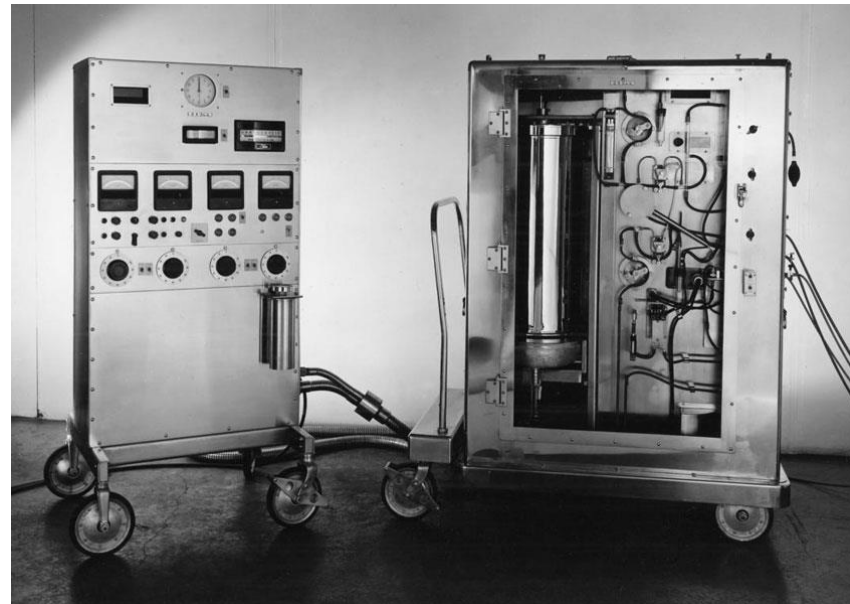
- Vývoj od 60. – 70. let 20. století
- Speciální přípravek – zvláštnosti
 - Separátory – vývoj
 - Dárci
 - Hyperleukocytární pacienti
 - Dárci nemobilizovaní
 - Dárci mobilizovaní
- Sedimentující látka



(Hem)aféréza – „ἄφαιρεσις” – přenášet / odstranit

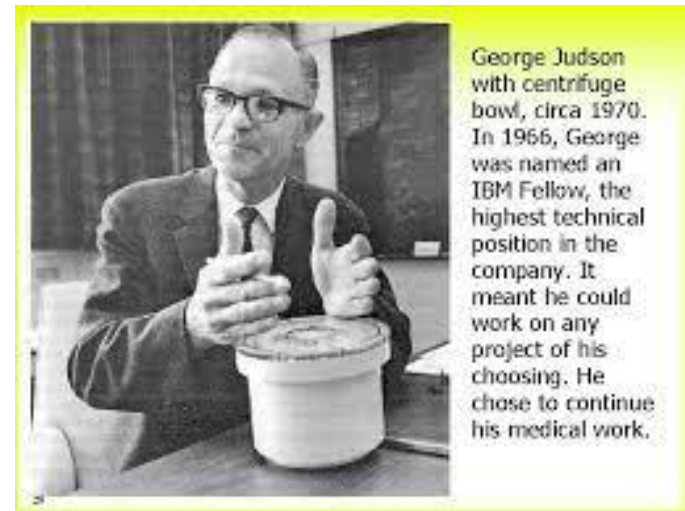


Figure 2-2. Attic vase (5th century B.C.). Depicts a physician about to bleed a patient. Below the patient is an ancient bleeding bowl. (Courtesy of Maurice Chassigny, Paris, and reproduced with the permission of the Secretary General of the Louvre Museum, Paris.)



Erich Freireich a George Judson, separátor IBM 2990, 2991

První separace leukocytů u pacienta s CML, 60. léta 20. století



Princip aferézy: centrifugační separace vybraných komponent z krve a návrat zbývajících složek do cirkulace pacienta / dárce

- Přístroj k separaci krevních komponent – granulocyty....a další
- Moderní terapeutická hemaferéza
 - Postupně další typy výkonů
- Buněčné přípravky – transplantace, protinádorová terapie....

Granulocyty – 2. polovina 20. století

- Transfuze granulocytů – specializovaná pracoviště
- Pacienti s prolongovanou neutropenií $< 0,5 \times (10^9 / l)$
 - Bakteriální a fungální infekce
 - Rozdíly v kvalitě přípravků, technikách, dávkách, možnosti pracovišť....
 - Kontrolované studie účinnosti – nejednoznačné výsledky
- Snížený zájem
 - Pokroky v antimikrobiální terapii a v podpůrné péči
 - Nežádoucí účinky, zvl. plicní komplikace, přenos CMV

Granulocyty

Začátek 21. století - nová vlna zájmu

- Mobilizace dárce PBPC i GA (G-CSF, kortikosteroidy, kombinace)
 - 3 – 4 násobné zvýšení připravené dávky granulocytů
- HEŠ – podpora sedimentace ery
- Granulocyty z aferézy (dávka $1 - 4 \times 10^{10}$ NT)
 - Terapeutická dávka NT minimálně 1×10^{10}
- Granulocyty z plné krve z BC, nemobilizovaní dárce, HES ne
 - $5 \times 10^8 / 1 \times 10^9$ NT
- Po podání cirkulují v oběhu příjemce
- Mají zachované funkce – prokázáno in vivo a in vitro testy
- Viabilita 24 h

Granulocyty z aferézy a z plné krve

242

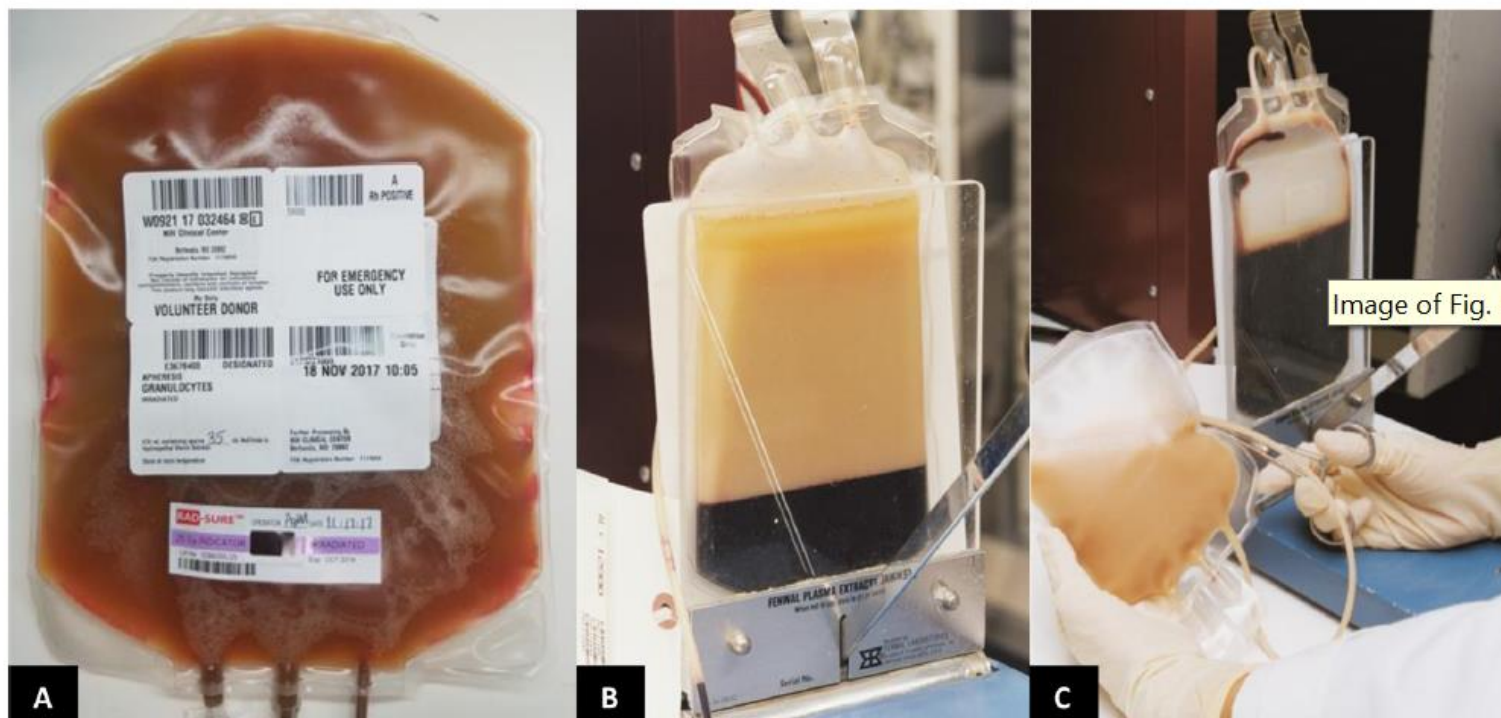
K.A. West and C. Conry-Cantilena/Seminars in Hematology 56 (2019) 241–247

Table 1

Content of granulocyte components according to procurement method.

	Volume (mL)	Hct (%)	Neutrophils ($\times 10^{10}$)	Lymphocytes ($\times 10^9$)	Platelets ($\times 10^9$)
Buffy Coat (single) [20]	55–65	35–59	0.04–0.2	0.6–2.8	50–105
Pooled Buffy Coat [20]	232–272	18–24	0.7–1.17	5.2–8.2	226–585
Apheresis (steroid only) ^a	215–330	10–15	1.2–2.7	1.5–2.0	50–180
Apheresis (G-CSF $\pm$ steroid) ^a	300–375	10–15	4.0–8.4	1.5–5.0	50–250

^a Internal data, NIH.



Granulocyty z aferézy - po mobilizaci G-CSF

244

K.A. West and C. Conry-Cantilena/Seminars in Hematology 56 (2019) 241–247

Table 2

Case series of adult patients treated with GTX in the G-CSF era.

Study	N	Study design	Response (Fungal)	Response (Bacterial)
Grigg (1996) [60]	11	Retrospective	0% resolved	100% resolved
Price (2000) [58]	19	Prospective	0% with IA cleared infection	100% resolution
Lee (2001) [39]	25	Prospective	73% response	45% response
Illerhaus (2002) [62]	18	Retrospective	55% IPA responded	78% septicaemia responded
Hubel (2002) [71]	74	Retrospective	18% mould, 55% yeast stable	NS
Rutella (2003) [68]	22	Retrospective	57% (0% response in IFI)	54% response
Mousset (2005) [61]	44	Prospective	78% response at 30 days	92% response at 30 days
Safdar (2006) [104]	20	Retrospective	45% CR or PR, 15% stable	NS
Ofran (2007) [105]	47	Retrospective	64% infection-related survival	53% infection-related survival
Quillen (2009) [66]	32	Retrospective	44% survival	58% overall survival to discharge
Al-Tanbal (2010) [106]	22	Retrospective	75% survival	68% clinical improvement
Ang (2011) [107]	15	Retrospective	31% cleared	63% cleared
Kim (2011) [91]	128	Retrospective	47% control of IFI	53% overall control of infection
Safdar (2014) [108]	74	Retrospective	45% patients had IFI	46% overall response
Wang (2014) [109]	56	Retrospective	87% 30-day survival	92% 30-day survival
Marciano (2017) [88]	40	Retrospective	82% success	94% success

CR = complete response; IFI = invasive fungal infection; IA = invasive aspergillosis; IPA = invasive pulmonary aspergillosis; PR = partial response; NS = not specified.

Table 3

Case series including pediatric patients treated with GTX in the G-CSF era.

Study	N	Study design	Response (Fungal)	Response (Bacterial)
Grigull (2006) [84]	32	Retrospective	67% survival	81% survival
Kikuta (2006) [80]	13	Prospective	50% response	73% response
Sachs (2006) [81]	27	Prospective	100% response	NS
Drewniak (2008) [76]	18	Prospective	73% response	100% response
Seidel (2009) [82]	69	Prospective	28-day survival probability 0.51 ± 0.12	28-day survival probability 0.89 ± 0.06
Graham (2009) [83]	13	Retrospective	50% survived to discharge	100% survived to discharge
Atay (2011) [78]	35	Retrospective	55% clinical response	65% clinical response
Ozturkmen (2013) [77]	10	Retrospective	50% response	80% response
Diaz (2014) [79]	18	Retrospective	80% response	100% response
Nikolajeva (2015) [110]	28	Retrospective	79% 100-day survival	50% 100-day survival



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Seminars in Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seminhematol

Granulocyte transfusions: Current science and perspectives

Kamille A. West*, Cathy Conry-Cantilena

Department of Transfusion Medicine, National Institutes of Health Clinical Center, Bethesda, MD

TRANSFUSION MEDICINE

(Blood. 2015;126(18):2153-2161)

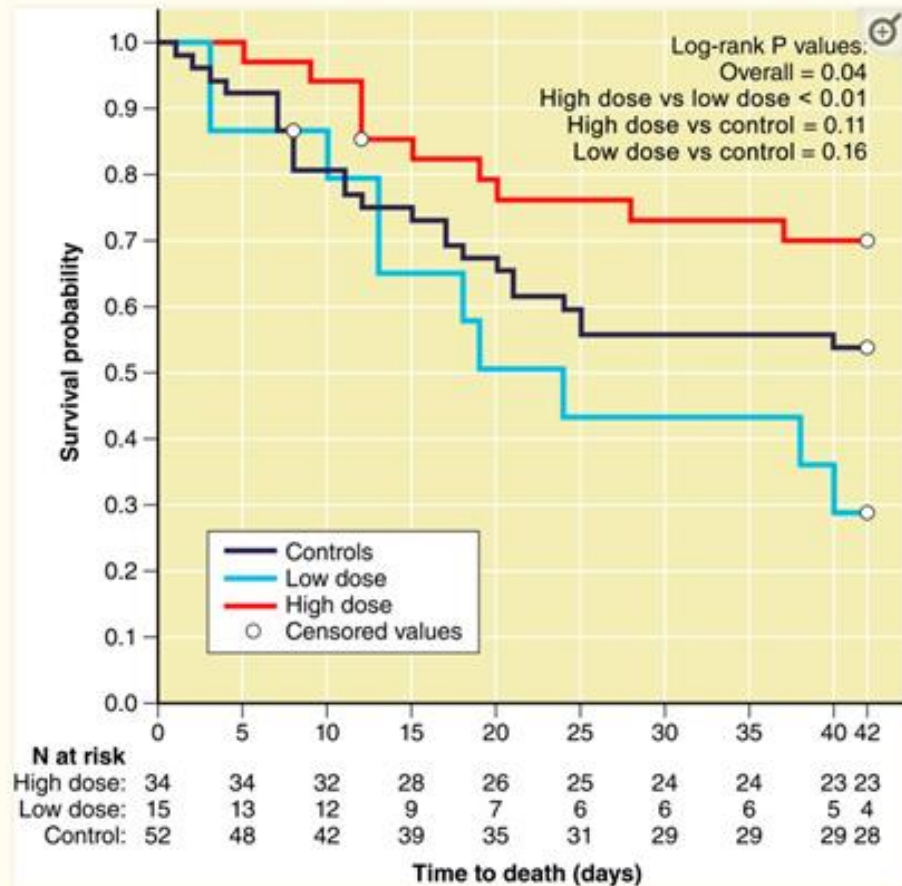
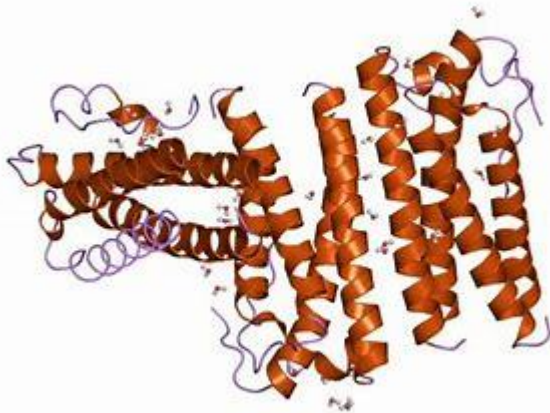
Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone–treated donors in neutropenic patients with infection

Thomas H. Price,^{1,2} Michael Boeckh,^{1,3} Ryan W. Harrison,⁴ Jeffrey McCullough,⁵ Paul M. Ness,⁶ Ronald G. Strauss,⁷ W. Garrett Nichols,^{3,8} Taye H. Hamza,⁴ Melissa M. Cushing,⁹ Karen E. King,⁶ Jo-Anne H. Young,⁵ Eliot Williams,¹⁰ Janice McFarland,¹¹ Jennifer Holter Chakrabarty,¹² Steven R. Sloan,¹³ David Friedman,¹⁴ Samir Parekh,¹⁵ Bruce S. Sachais,^{16,17} Joseph E. Kiss,^{18,19} and Susan F. Assmann⁴

Granulocyty z aferézy

- T. Price 2014, Blood
- „The RING study: A Randomized Controlled Trial of GCSF – stimulated Granulocytes in Granulocytopenic patients“
 - Výsledky ovlivněné nízkým počtem pacientů zařazených do studie
- GA neovlivnily dobu přežití pacientů (42. den po podání GTX)
- Pacienti léčení vyššími dávkami GA – lepší výsledky než pacienti léčení nižšími dávkami

Dávky mobilizovaných granulocytů ≥ nebo < než $0,6 \times 10^9$ / kg příjemce (T.H. Price, 2015)



Survival to 42 days by dose group of patients enrolled in the RING trial. The high-dose group ($n = 29$) included all subjects in the transfusion arm who received a mean dose of $\geq 0.6 \times 10^9$ granulocytes/kg and transfusion and had data available on the primary outcome (red line); the low-dose group ($n = 13$) included all subjects in the transfusion arm who received a mean dose of $< 0.6 \times 10^9$ granulocytes/kg and transfusion and had data on the primary outcome (blue line); the control group for this comparison ($n = 43$) included subjects in the control arm who received no transfusions and had data on the primary outcome (black line). The figure is a modification of Figure 6 in the article by Price et al that begins on page 2153. Figure prepared by Patrick Lane, ScEYence Studios.

Granulocyty z aferézy – Příprava a separace



Granulocyty z aferézy – Příprava

- Transfuzní terapie – plánování a koordinace
 - Požadavek – nalehavost
 - Příprava k separaci granulocytů cca 1 – 2 dny
 - Dárce – mobilizace, citrát, HEŠ...
- Dárce
 - Registry dárců granulocytů... ?
 - Mobilizace dárce
 - G-CSF schválená jen u dárců PBPC....(nejen v ČR)
 - Příbuzní, přátelé – obvykle se akceptují
 - ABO a Rh
 - Dárci nejsou vybíráni dle kompatibility HLA
 - CMV negativní pro CMV negativní příjemce

Granulocyty z aferézy – Technické zajištění separace

- Roztok citrátu Na 46,7%
 - Příprava lékárna - prodleva 1 až 2 dny
- HEŠ 6% m. h. 130 / 0,4, Voluven, Fresenius
- EMA, SÚKL od 2019 povinnost minimalizace rizik
 - ESA – lékaři podávající HEŠ / registrace a školení o použití HEŠ / certifikát / akreditace instituce
- Řízená distribuce HEŠ
 - Dohoda poskytovatel zdravotní péče × dodavatel
 - Bez ní nelze HEŠ instituci dodat

■ Separace granulocytů

K separaci GA / 500 ml 6% HEŠ v kombinaci s citrátem sodným, ÚHKT za posledních 5 let:

- v separačním okruhu průměrně 403 (337 – 421) ml HEŠ
- dárce dostane 362 (298 – 381) ml, tj. **< 30 ml/kg /24 h u 6% roztoků**
- v připraveném LP - granulocyty z aferézy je v průměru **39** (35 – 45) ml HEŠ, které se podají s GA pacientovi

Granulocyty z aferézy - Dárce

- Způsobilost dárce – kritéria pro dárce
 - Bezpečnost podání HEŠ / AA
 - G-CSF 5 µg/kg s.c. 6 -16 h před (± dexamethason 4-8 mg p.o.)
- Cílová dávka granulocytů
 - 1×10^{10} , optimálně 4×10^{10} a vyšší, tj.
 - $0,6 (1) \times 10^9 / \text{kg}$ pro příjemce cca 70 kg
 - Proporcionální redukce dávky pro příjemce < 30 kg
- Kontrola dárce po separaci
 - KO, hmotnost, TK, zn. hypervolémie...
- Dlouhodobé sledování bezpečnosti dárce po mobilizaci a separaci vs. méně zatěžující než mobilizace dárců PBPC

Granulocyty z aferézy – Vyšetření, propuštění, výdej

- Laboratorní vyšetření
 - Infekční markery a KS
- Testy slučitelnosti před podáním
 - Červená řada
 - Bílá řada
 - LCT
 - Protilátky proti specifickým granulo antigenům příjemce i dárce...doporučeno
- Ozáření ionizujícím zářením ^{137}Cs
- Podání „co nejdříve“, optimálně do 6 h, viabilní max. 24 h
- Vitální známky, saturace O_2

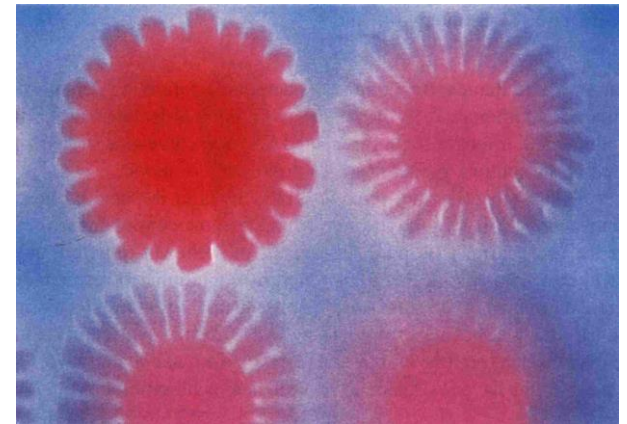
Separace GA, 2015-2021	Před separací mobilizace Rh-GCSF	Po separaci
Dárci 42 (19 – 62) l Příjemci	12 (muži 7, ženy 5) 6 dárců opakované darování / 6	
Separace	18	
Leukocyty v PK ($10^9/l$)	30 (23 – 45)	25 (18 – 37)
Hemoglobin (g/l)	14,4 (12,5 – 17)	12,2 (10,7 – 14,9)
Trombocyty ($10^9/l$)	239 (158 – 322)	203 (129 – 276)
Odebrané leukocyty (%)	21 (8 – 27)	
Odebrané trombocyty (%)	15 (5 – 20)	

Separační parametry, Spectra Optia, 12 dárců, 18 výkonů	Separace GA, 2015 – 2021
Objem zpracované krve (ml)	5248 (4044 – 8293)
Objem zpracované krve (× celkový objem krve dárce)	1,1 (0,9 – 1,7)
HEŠ 6% + Na citras „k dárci“ (ml)	366 (298 – 609)
HEŠ 6% + Na citras „vak s GA“ (ml)	40 (28 – 50)
Doba výkonu celkem (minuty)	203 (147 – 260)
Pokles iCa „o“ (%)	10 (2 – 28)
Komplikace separací, NZV	2 (hypotenze, žilní přístup)

Přípravek GA, Spectra Optia, 12 dárců, 18 výkonů	Separace GA, 2015 – 2021
Objem (ml)	367 (250 – 440)
Granulocyty (PMN) dávka (10^{10} / vak)	1,8 (1,2 – 5,5)
Granulocyty ve vaku, FCM (%)	73 (6 – 86)
Hemoglobin (g / l)	4 (1 – 6)
Hematokrit (%)	3,5 (3 – 7)
Trombocyty (10^{11})	1,3 (0,7 – 1,7)

Granulocyty – Kazuistika

- 20 letá žena hospitalizace na ORL pro tonsillitis lingualis – peritonsilární absces, neutropenie, CRP > 300, prokalcitonin
- Stomatochirurgický zákrok - drenáž abscesu
- Septický šok - KARIM
 - OTI a UPV
- Dřeňová aplazie (transitorní)
 - Neutropenie $0,2 - 0,3 \times 10^9/l$
- Hemokultura – Serratia Marcescens
- Cílená ATB terapie + GA
 - Dárci z našeho registru, zvláště připravený písemný souhlas...
 - Dvě dávky $2,7$ a $1,8 \times 10^{10}$
- Snížení zánětlivých markerů, zlepšení lokálního nálezu vzestup leukocytů $2 \times 10^9/l$

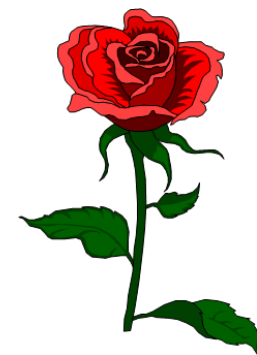


Granulocyty – Závěr

- Speciální přípravek – klinické aplikace cca 50 let
 - Obtížné stanovení účinnosti – kontroverzní závěry
- Neutropeničtí pacienti s refrakterní bakteriální / fungální infekcí
 - Velké riziko mortality
- Přínos a rizika GTX – individuální přístup k terapii
- Komplikace – závažné plicní, HLA aloimunizace a CMV
- Prevence progresu infekcí u HSCT indukované neutropenie ?
- Možnost přípravy vysoké dávky $0,6 (1) \times 10^9 / \text{kg}$ příjemce ?
- Studie s vyhodnocením efektu vysokých dávek GTX
 - Jednoznačná definice terapeutické odpovědi



Děkuji vám za vaši pozornost
Poděkování
pracovnícím a pracovníkům Aferetického oddělení ÚHKT



Mobilizace PBPC z KD do krve

CXCR4 – chemokinový receptor specifický pro SDF – 1 α

Interakce mezi SDF – 1 α a CXCR4
zadržení hematopoetických kmenových buněk (HSC)
v kostní dřeni

Degradace SDF – 1 α

G-CSF aktivace NT elastázy v KD & proteolytická
degradace SDF – 1

Blokátory CXCR4

Plerixafor (Mozobil)