Pregledi
Reviews

OSOBITOSTI SKUPLJANJA AUTOLOGNIH KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA IZ PERIFERNE KRVI U PEDIJATRIJSKIH BOLESNIKA

AUTOLOGOUS PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTION IN PEDIATRIC PATIENTS

INES BOJANIĆ, BRANKA GOLUBIĆ ĆEPULIĆ, DAMIR NEMET, LJUBICA RAJIĆ, DRAGO BATINIĆ, BORIS LABAR*

Deskriptori: Transplantacija krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi – metode; Leukafereza – metode, neželjene reakcije; Mobilizacija hematopoetskih matičnih stanica – metode; Transplantacija, autologna; Djeca

Sažetak. Krvotvorne matične stanice (KMS) skupljene iz periferne krvi postupkom leukafereze sve se više rabe umjesto koštane srži za potrebe autologne transplantacije i u odraslih bolesnika i u djece. U ovom radu analizirane su 73 leukafereze učinjene u 25-ero djece s hematološkim malignim bolestima i solidnim tumorima. Djeca su bila u dobi od 3 do 18 godina (medijan 15 godina) s tjelesnom težinom od 16 do 67 kg (medijan 48 kg). KMS su skupljene iz periferne krvi staničnim separatorom s kontinuiranim protokom COBE Spectra. Bolesnicima su učinjene od 1 do 6 leukafereza (medijan 2). Medijan ukupnog broja skupljenih stanica s jezgrom bio je $11,86\times10^8$/kg (raspon 1,94–21,21), mononuklearnih stanica $6,01\times10^8$/kg TT (raspon 0,97–12,73) i CD34+ stanica $3,5\times10^6$/kg TT$\times10^4$/kg TT (raspon 0,19–28,01). Nepoželjne reakcije javile su se tijekom 6 (8,22%) leukafereza. Najčešći su bili simptomi hipokalcemije zbog infuzije citrata. Te reakcije bile su blage, a samo jedan postupak skupljanja morao je biti prekinut zbog problema s venskim protokom. Rezultati ovog istraživanja, s obzirom na učinkovitost skupljanja i malen broj nuspojava, pokazuju da je leukafereza siguran postupak koji može uspješno nadomjestiti skupljanje KMS vađenjem koštane srži.

Descriptors: Peripheral blood stem cell transplantation – methods; Leukapheresis – methods, adverse effects; Hematopoietic stem cell mobilization – methods; Transplantation, autologous; Child

Summary. Autologous peripheral blood stem cells are increasingly used for transplantation instead of bone marrow, even in small children and adolescents. We analyzed 73 autologous leukaphereses performed in 25 children (36% males, 64% females). The median age was 15 years (range 3–18) and the median body weight 48 kg (range 16 –67). The apheresis procedures were carried out with cell separator COBE Spectra. Each patient underwent a median of 2 collections (range 1–6). The median total nucleated cell yield was 11.86×108/kg (range 1.94–21.21), mononuclear cell yield was 6.01×10^8/kg (range 0.97–12.73) and CD34+ cell yield was 3.5×10^6/kg (range 0.19–28.01). During 6 (8.22%) procedures the patients had experienced apheresis-related side effects. The citrate-induced reactions were most commonly observed. The reactions were mild and cessation of collection was required only in one case, because of catheter related complication. Our results show that leukapheresis in pediatric patients is a safe procedure, well tolerated and with a very low risk of serious adverse events.

Liječ Vjesn 2006;128:43–48

U posljednjih je deset godina skupljanje krvotvornih matičnih stanica (KMS) iz periferne krvi postupkom leukafereze gotovo potpuno zamijenilo koštanu srž kao izvor KMS-a za potrebe autologne transplantacije u odraslih bolesnika s malignim hematološkim bolestima i solidnim tumorima. Postupkom leukafereze stanice se periferne krvi u staničnome separatoru raslojavaju diferencijalnim centrifugiranjem s obzirom na specifičnu gustoću, što omogućuje izdvajanje i skupljanje mononuklearnih stanica, dok se ostale krvne stanice vraćaju bolesniku.

Iako se i u djece rabe isti stanični separatori, primjena tog postupka u toj dobnoj skupini znatno je složenija. Glavni ograničavajući čimbenici jesu teškoće u pronalaženju prikladnoga venskog pristupa, relativno velik volumen krvi u izvantjelesnom optoku, metaboličke promjene uzrokovane različitom kombinacijom antikoagulantnih otopina i suradnja djeteta tijekom postupka koji traje više sati.[1] Za uspješno skupljanje KMS-a nužno je osigurati dobar protok krvi kroz stanični separator. Budući da su u djece krvne žile manjeg promjera, ovisno o veličini djeteta moraju se rabiti i različite vrste katetera. Ovisno o vrsti staničnog separatora, u izvantjelesnom optoku se tijekom leukafereze nalazi od 180 do 370 ml krvi bolesnika. To je količina koja u manje djece može izazvati hemoragički šok. Krv se prolaskom kroz separator hladi, pa tijekom leukafereze može doći do sniža-vanja tjelesne temperature djeteta. Hipotermija, uz metaboličke promjene koje prate primjenu antikoagulantnih oto-

* **Zavod za kliničku transfuziologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb** (mr. sc. Ines Bojanić, dr. med; mr. sc. Branka Golubić Ćepulić, dr. med.); **Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Damir Nemet, dr. med.; prof. dr. sc. Boris Labar, dr. med.); **Zavod za hematologiju i onkologiju, Klinika za pedijatriju Šalata, KBC Zagreb** (doc. dr. sc. Ljubica Rajić, dr. med.); **Zavod za imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. I. Bojanić, Zavod za kliničku transfuziologiju, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb; e-mail: ibojanic@kbc-zagreb.hr

Primljeno 29. lipnja 2005., prihvaćeno 25. listopada 2005.

pina, povećava rizik od pojave nepoželjnih reakcija. Važan je problem i emocionalni stres kojemu su tijekom dugotrajnog postupka leukafereze izložena i djeca i njihovi roditelji. Zbog svega navedenoga u djece se može očekivati veći broj nepoželjnih reakcija nego u odraslih. Stoga sigurnost djeteta tijekom leukafereze zahtijeva individualno prilagođavanje tehnike skupljanja svakom djetetu.

Cilj ovog rada je prikazati naša iskustva u skupljanju autolognih KMS-a u djece s hematološkim malignim bolestima i solidnim tumorima, posebice u odnosu na sigurnost postupka leukafereze.

Bolesnici i metode

U razdoblju od siječnja 2000. do prosinca 2004. godine u Zavodu za kliničku transfuziologiju KBC-a Zagreb učinjene su 73 leukafereze u cilju skupljanja autolognih KMS-a iz periferne krvi u sveukupno 25-ero djece s hematološkim malignim bolestima i solidnim tumorima. Djeca su bila u dobi od 3 do 18 godina (medijan 15 godina) s tjelesnom težinom od 16 do 67 kg (medijan 48 kg). Obilježja bolesnika navedena su na tablici 1.

Mobilizacija KMS: U 20 (80%) bolesnika mobilizacija KMS-a u perifernu krv potaknuta je primjenom različitih kombinacija citostatika uz granulocitni čimbenik stimulacije rasta (engl. granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) (Neupogen, Roche, Švicarska) u dozi od 5 do 10 μg/kg tjelesne težine (TT) (tablica 2). Vrsta kemoterapije kojom su mobilizirane KMS ovisila je o vrsti bolesti. U jednog je djeteta zbog nedovoljnog broja prikupljenih CD34+ stanica nakon 4 tjedna ponovljena mobilizacija KMS-a samo s G-CSF-om u dozi od 10 μg/kg TT. U 5 (20%) bolesnika mobilizacija KMS-a potaknuta je samo G-CSF-om, koji je primijenjen supkutano tijekom 5 dana u dozi od 10 μg/kg TT. Skupljanje KMS-a započeto je kada je broj CD34+ krvotvornih matičnih stanica u krvi bolesnika bio veći od 10×10^6/L. Bolesnici su primali G-CSF do završetka skupljanja KMS-a. Cilj je bio skupiti najmanje 2×10^6 CD34+ stanica /kg TT, a optimalno 5×10^6 CD34+ stanica/kg TT.

Tablica 1. *Obilježja bolesnika*
Table 1. *Patient characteristics*

Broj bolesnika / Number of patients (N)	25
Spol / Sex	
muški / male	9 (36%)
ženski / female	16 (64%)
Dob (god.) / Age (yrs) *(median / range)*	15 (3–18)
Težina / Weight (kg) *(median / range)*	48 (16–67)
Ukupan volumen krvi / Total blood volume (ml) *(median / range)*	3423 (1135–4831)
Dijagnoza / Diagnosis	
Hodgkinova bolest / Hodgkin's disease	7
Neuroblastom / Neuroblastoma	7
Akutna leukemija / Acute leukaemia	6
Ewingov sarkom / Ewing's sarcoma	2
Ne-Hodgkinov limfom / Non-Hodgkin's lymphoma	1
Ganglioneuroblastom / Ganglioneuroblastoma	1
Meduloblastom / Medulloblastoma	1
Prijašnje liječenje / Prior therapy	
Ciklusi kemoterapije / Cycles of prior chemotherapy *(median / range)*	6 (1–16)
Prethodna radioterapija / Previous radiotherapy (N, %)	7 (28%)

Tablica 2. *Mobilizacija KMS-a i postupci leukafereze*
Table 2. *HSC mobilization and leukapheresis procedures*

Vrsta mobilizacije / Mobilization methods	
Kemoterapija + G-CSF / Chemotherapy + G-CSF (N, %)	20 (80%)
Samo G-CSF / G-CSF alone (N, %)	5 (20%)
Venski pristup / Venous access	
dvoluminalni centralni venski kateter / dual lumen central venous catheter	
v. supklavija / subclavian vein (N, %)	10
v. jugularis / jugular vein (N, %)	2
v. femoralis / femoral vein (N, %)	13
Ukupan broj leukafereza / Total number of leukapheresis procedure	73
medijan (raspon) / median (range)	2 (1–6)

Broj postupaka leukafereze na ciklus mobilizacije / Number of leukapheresis procedures per mobilization cycle

Ukupan broj leukafereza / Total number of leukapheresis	Broj bolesnika / Number of patients
1	5
2	8
3	7
4	2
5	2
6	1

G-CSF: granulocitni čimbenik stimulacije rasta / granulocyte colony stimulating factor

Skupljanje KMS: Bolesnicima je zbog leukafereze postavljen dvoluminalni centralni venski kateter: 13 u femoralnu venu, 10 u venu supklaviju i 2 u jugularnu venu. Za veću djecu upotrijebljen je dvoluminalni kateter veličine 12 Fr, 20 cm (Dualise-Cath, Vygon, Francuska), a za djecu tjelesne težine manje od 25 kg dvoluminalni kateter veličine 8 Fr, 12 cm (Hemo-Chat Double Lumen, Medcomp, SAD). Budući da se zbog veličine krvnih žila u jednog djeteta nije mogao uvesti dvoluminalni kateter, postavljena su u periferne vene dva jednoluminalna katetera veličine 4 Fr, 10 cm (Leader Cath, Vygon, Francuska). Za skupljanje KMS-a rabio se stanični separator (COBE Spectra: Version 6,0, Gambro BCT, Lakewood, SAD) s programom za skupljanje mononuklearnih stanica periferne krvi (MNC procedure) čiji ekstrakorporalni volumen iznosi 284 mL. U svakom skupljanju učinjene su leukafereze velikog volumena krvi (LVL), što znači da su procesirana 3 ili više volumena ukupne krvi bolesnika. Za sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom leukafereze upotrijebljen je antikoagulans ACD-A (acidi citrici, dekstroza, formula A) u kombinaciji s heparinom (6 i.j. heparina/mL ACD-A).

U svim leukaferezama upotrebljavan je grijač za krv SpectraTHERM (Gambro BCT, Lakewood, SAD) koji je bio spojen na liniju kojom se krv vraća bolesniku. Tijekom postupka bolesnici su preventivno primali kontinuiranu infuziju kalcija (kalcij glukonat 1 g/10 kg TT) u fiziološkoj otopini radi sprječavanja eventualnih nepoželjnih učinaka infuzije citrata. U cilju sprječavanja hemodilucije na početku leukafereze, za 6 bolesnika čija je tjelesna težina bila manja od 25 kg, stanični separator je prije početka skupljanja ispunjen ozračenim koncentratom eritrocita sa smanjenim brojem leukocita. U ovih 6 bolesnika su također tijekom leukafereze trajno praćeni krvni tlak, puls i EKG. Tijekom svih postupaka leukafereze omogućeno je da uz djecu budu prisutni roditelji.

Određivanje brojnosti KMS-a: Broj KMS-a u perifernoj krvi i produktu leukafereze određen je mjerenjem udjela CD34+ stanica s pomoću protočne citometrije prema pro-

Tablica 3. *Pokazatelji postupka leukafereze*
Table 3. *Leukapheresis procedure parameters*

	median (range)
Trajanje postupka / Procedure time (min)	240 (120 – 270)
Procesiran ukupni volumen krvi / Processed total blood volume (x)	4,5 (3,1–5,1)
Procesiran volumen krvi / Processed blood volume (mL)	11 754 (2700–22 500)
Ulazni protok krvi / Inlet blood flow rate(mL/min)	54,5 (16,0–95,4)
Volumen ACD-A / AC volume (mL)	696 (133–984)
Volumen produkta leukafereze / Product volume (mL)	224 (158–305)

Tablica 4. *Analiza produkata leukafereze*
Table 4. *Analysis of leukapheresis product*

	medijan (raspon) / median (range)	x±SD
Broj stanica s jezgrom × 10^8/kg TT / Total nucleated cells × 10^8/kg BW	3,88 (1,2–9,8)	4,30±2,03
Mononuklearne stanice × 10^8/kg TT / Mononuclear cells × 10^8/kg BW	2,24 (0,48–6,78)	2,53±1,54
Htc % / Htc %	2 (0–5)	1,63±1,25
CD34+ stanice × 10^6/kg TT / CD34+ cells × 10^6/kg BW	0,86 (0,1–22,2)	2,04±3,74
CFU-GM × 10^4/kg TT / CFU-GM × 10^4/kg BW	21 (1,4–104,8)	27,04±21,92
Učinkovitost skupljanja MNC % / MNC collection efficiency%	56,11 (12,34–158,09)	60,46±30,58

CFU-GM: colony forming units-granulocyte macrophage

tokolu ISHAGE.[2] U tu svrhu rabljena su monoklonska protutijela anti-CD45-FITC (klon 2D1) i anti-CD34-PE (klon 8G12) (BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka) i protočni citometri FACScan i FACSCalibur (BD Biosciences). Broj stanica koje *in vitro* stvaraju kolonije granulocita i makrofaga (CFU-GM, prema engl. colony-forming unit-granulocyte/macrophage), a koje predstavljaju usmjerene krvotvorne prastanice navedenih loza, određen je opisanom metodom kratkotrajnog uzgoja stanica produkta leukafereze u polučvrstom mediju rabeći komercijalni pripravak MethoCult H4433 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada).[3]

Statističke metode: Rezultati istraživanja izraženi su kao aritmetičke sredine (x) ± standardna devijacija (SD), odnosno medijani s rasponom. Značajnost razlike u broju stanica u perifernoj krvi prije i nakon postupka leukafereze analizirana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom. Razlika je smatrana statistički značajnom na razini značajnosti od 0,05 ($p<0,05$).

Rezultati

Bolesnicima su učinjene od 1 do 6 leukafereza (medijan 2). Ulazni protok krvi bio je od 16,0 do 95,4 mL/min (medijan 54,5), a procesirano je od 3,1 do 5,1 put ukupan volumen krvi bolesnika (medijan 4,5), odnosno 2 700 do 22 500 ml (medijan 11 754) krvi. Leukafereze su trajale od 120 do 270 min (medijan 240), a volumen prikupljenog produkta bio je 158 do 305 mL (medijan 224) (tablica 3).

Obilježja produkata leukafereza prikazana su na tablici 4. Učinkovitost skupljanja mononuklearnih stanica bila je 56,11% (raspon 12,34–158,09%). Medijan ukupnog broja

Tablica 5. *Osobine bolesnika i broj skupljenih stanica*
Table 5. *Characteristics of patients at PBSC collection and number of collected cells*

Red. broj Case No.	Dob (god.) Age (yrs)	TT (kg) BW (kg)	Dijagnoza Diagnosis	Broj leukafereza No. of leukapheresis	Ukupan broj skupljenih stanica Total number of collected cells			
					TNC ×10^8/kg	MNC × 10^8/kg	CD34 × 10^6/kg	CFU-GM × 10^4/kg
1.	17	47	NHL	2	6,25	2,88	3,62	35,1
2.	16	64	Mb. Hodgkin	3	4,60	2,29	2,12	18,66
3.	18	52	Mb. Hodgkin	4	13,52	12,35	2,02	118,46
4.	11	27	Neuroblastoma	1	1,94	0,97	0,19	6,4
5.	17	54	ALL	2	4,89	2,45	4,10	97,8
6.	15	60	Mb. Hodgkin	3	21,21	10,10	4,10	80,6
7.	12	67	Mb. Hodgkin	2	8,78	3,94	1,00	53,25
8.	18	57	ALL	1	9,84	4,72	13,09	84,6
9.	8	24	Neuroblastoma	3	15,23	8,62	2,37	130,17
10.	18	51	Mb. Hodgkin	1	12,53	10,04	12,82	117,36
11.	5	18	Neuroblastoma	3	13,87	7,58	3,63	53,2
12.	16	45	ALL	1	10,76	3,75	28,01	110,5
13.	17	48	ALL	2	5,45	1,67	3,50	34,32
14.	4	17	Neuroblastoma	2	3,08	2,13	0,40	3,60
15.	15	47	Neuroblastoma	5	17,09	10,34	2,19	65,29
16.	3	16	Neuroblastoma	5	19,46	10,53	2,53	121,4
17.	13	51	Mb. Hodgkin	6	16,42	6,01	2,19	66,31
18.	15	38	Mb. Hodgkin	3	19,39	11,18	6,55	127,3
19.	14	64	Ewing's sarcoma	3	13,33	7,70	5,51	55,3
20.	8	24	Ganglioneuroblastoma	2	16,96	12,73	5,58	180,7
21.	16	60	ALL	2	14,95	12,19	1,04	33,3
22.	4	16	Neuroblastoma	2	11,86	9,33	10,61	104,9
23.	16	65	ALL	1	10,37	4,70	18,55	133,7
24.	3	18	Ewing's sarcoma	3	16,69	10,09	7,18	170,77
25.	4	20	Medulloblastoma	4	20,14	12,05	2,29	47,38

Tablica 6. *Incidencija nepoželjnih reakcija*
Table 6. *Incidence of adverse events*

	N	%
Broj leukafereza praćenih nuspojavama Number of leukapheresis with adverse events	6/73	8,22
Simptomi hipokalcemije uzrokovani citratom (perioralne i/ili periferne parestezije) Citrate-related symptoms of hypocalcemia (perioral and/or peripheral paresthesias)	4/6	66,7
Problemi s centralnim venskim kateterom (krvarenje, smetnje protoka) Problems with central venous catheter (hemorrhage, access occlusion)	2/6	33,3

Tablica 7. *Broj stanica u perifernoj krvi prije i nakon leukafereze*
Table 7. *Preapheresis and postapheresis peripheral blood cell count*

	Prije leukafereze* Preapheresis*	Poslije leukafereze* Postapheresis*	p
Leukociti × 10^9/L Leukocytes × 10^9/L	14,85 (1,9–43,8) 19,41±13,66	9,45 (1,1–32,2) 12,34±9,17	0,0001
Mononuklearne stanice × 10^9/L Mononuclear cells × 10^9/L	2,25 (0,46–7,75) 2,56±1,65	1,05 (0,34–3,81) 1,25±0,75	0,0001
Hgb (g/L)	100 (71–148) 102,49±15,87	89 (68–126) 92±14,99	0,0001
Htc (%)	28,5 (20–43) 29,73±5,09	25,5 (19–37) 26,75±4,63	0,0001
Trombociti × 10^9/L Platelets × 10^9/L	71,5 (37–275) 101,00±66,10	43.50 (18–153) 53,56±34,44	0,0001
CD34+ stanice × 10^6/L CD34+cell × 10^6/L	14,97 (1,6–263,5) 33,77±57,40	–	–

medijan (raspon), x±SD / median (range), x±SD

skupljenih stanica s jezgrom (engl. total nucleated cell, TNC) bio je 11,86×10^8/kg (raspon 1,94–21,21), mononuklearnih stanica (MNC) 6,01×10^8/kg TT (raspon 0,97–12,73), CD34+ stanica 3,5×10^6/kg TT×10^4/kg TT (raspon 0,19–28,01), a stanica koje stvaraju granulocitno-makrofagne kolonije (CFU-GM) 66,31×10^4/kg TT (raspon 3,6–180,7) (tablica 5). Jednim postupkom leukafereze skupljeno je ≥2×10^6 CD34+ stanica/kg TT u 9 (36%) djece. U 4-ero (16%) djece leukaferezama se nije uspio skupiti dovoljan broj stanica za transplantaciju pa su u njih KMS prikupljene vađenjem koštane srži.

Nepoželjne reakcije javile su se tijekom 6 (8,22%) leukafereza (tablica 6). Najčešći su bili simptomi hipokalcemije zbog infuzije citrata. Te reakcije bile su blage, a očitovale su se trncima na licu i okrajinama. U dvoje djece javili su se problemi s venskim protokom. U jednog je djeteta došlo do jakog krvarenja na mjestu postavljanja katetera, zbog čega je postupak skupljanja prekinut. U drugog djeteta leukafereza je započeta na trajni centralni Hickmanov kateter, međutim zbog slabog protoka nije bilo moguće skupiti stanice. Stoga je postavljen jugularni kateter, nakon čega je uspješno skupljen dovoljan broj stanica. Tijekom postupka je blaga sedacija (fenobarbiton 6 mg/kg TT im.) bila potrebna samo za najmanju djecu, a i kod njih samo pri prvom postupku leukafereze, dok su daljnji postupci protekli uredno bez premedikacije. Kod djece kod koje je tijekom leukafereze kontinuirano praćen krvni tlak, puls i EKG nisu opažena odstupanja od normale.

Na tablici 7. prikazane su vrijednosti stanica u krvi prije i nakon postupka leukafereze. Nakon leukafereze je kod svih bolesnika opažen značajan pad hemoglobina, hematokrita, leukocita i trombocita (p<0,0001). Medijan pada broja trombocita nakon leukafereze u odnosu na broj prije leukafereze bio je 43% (raspon 7,0–63,7%). Samo nakon 3 leukafereze broj je trombocita bio manji od 30×10^9/L, što je zahtijevalo transfuziju trombocita prije sljedeće leukafereze. Budući da su djeca tijekom leukafereze profilaktički primala infuziju kalcija, nakon leukafereze su vrijednosti kalcija bile u granicama normale.

Rasprava

Iako su prvi radovi o leukaferezama u pedijatrijskih bolesnika objavljeni još krajem osamdesetih godina 20. stoljeća, malen broj govori o djeci manje tjelesne težine.[4–9] Ta su istraživanja heterogena s obzirom na dijagnozu, prethodno liječnje, protokol mobilizacije KMS-a i vrstu staničnog separatora. Zbog tih je razloga teško kritički usporediti rezultate različitih studija i stoga svaki centar koji se bavi aferezama treba pratiti vlastite rezultate skupljanja i po potrebi prilagoditi postupak.

Mobilizacija KMS-a

U perifernoj krvi nalazi se malen broj KMS-a pa je stoga vrlo teško skupiti dovoljan broj stanica za transplantaciju. Stoga se KMS prije skupljanja moraju potaknuti, tj. mobilizirati na izlazak iz koštane srži u perifernu krv. U djece, kao i u odraslih, do povećanja broja KMS-a u perifernoj krvi dolazi u fazi ranog oporavka nakon kemoterapije ili se u tu svrhu rabe krvotvorni čimbenici rasta.[10] U našoj skupini bolesnika najčešće je rađena mobilizacija kemoterapijom i čimbenicima rasta (80%), dok je u svega 5-ero djece mobilizacija potaknuta samo krvotvornim čimbenikom rasta. Zbog nedovoljne mobilizacije KMS kemoterapijom, u jednom je slučaju mobilizacija bila ponovljena samo s čimbenikom rasta. Postupak mobilizacije mogu pratiti nepoželjne reakcije koje mogu utjecati na tijek leukafereze. Budući da kemoterapija uzrokuje aplaziju koštane srži, bolesnici su neposredno prije skupljanja u pravilu citopenični. Osobito je važan broj trombocita, koji u djece prije stavljanja katetera mora biti veći od 50×10^9/L. Stoga su često potrebne transfuzije trombocita, kao što je bio i slučaj u 5-ero djece koja su prije početka leukafereze i postavljanja katetera primila transfuziju trombocita. U djece se nakon kemoterapije javljaju i poremećaji koncentracije elektrolita, koji moraju biti korigirani prije leukafereze, jer sam postupak leukafereze može pogoršati postojeći poremećaj. Mobilizacija KMS-a primjenom samo krvotvornog čimbenika rasta također je praćena nuspojavama kao što su bol u kostima i mišićima, glavobolja i blagi porast temperature.[11–14] Iako se u svih naših bolesnika 4. i 5. dana primjene čimbenika javila blaga bol u kostima i mišićima, primjena analgetika nije bila potrebna. U sve djece nijedan način mobilizacije KMS-a nije bio praćen teškim nuspojavama, što odgovara i rezultatima u literaturi.[11–14]

Venski pristup

Tijekom afereze djeca, kao i većina odraslih bolesnika, trebaju centralni venski put radi održavanja zadovoljavajućeg protoka krvi kroz stanični separator. Zato je najčešće potrebno postaviti dvoluminalni kateter u neku od velikih krvnih žila.[1,15] Kateteri za aferezu trebaju biti dovoljno tvrdi i čvrsti kako negativni tlak koji stvara stanični separator tijekom uzimanja krvi ne bi slijepio njihove stijenke. Ulazni i izlazni otvori katetera moraju biti na suprotnim stranama radi smanjenja recirkuliranja krvi između njih. U naših boles-

nika kateter je najčešće bio postavljan u femoralnu venu, a u veće djece u venu supklaviju. U dvoje djece (8%) javile su se teškoće s venskim pristupom. U jednog je djeteta leukafereza pokušana s pomoću standardnog Hickmanova katetera koji je bio uveden na početku liječenja bolesti. Međutim, iako je kateter bio dobro prohodan neposredno prije leukafereze, za skupljanja se pokazao nedostatnim. Protok je od samog početka skupljanja bio loš i povremeno se potpuno gubio zbog negativnog tlaka ulazne pumpe. Stoga je morao biti uveden dvoluminalni kateter za aferezu u jugularnu venu. U drugog su se djeteta tijekom leukafereze javili bol i opsežno krvarenje, a potom i hematom na mjestu uvođenja katetera u femoralnu venu, zbog čega je daljnji postupak skupljanja prekinut. I u drugim se istraživanjima navodi da su u djece česte nuspojave tijekom uvođenja centralnoga venskog katetera.[9,16]

Volumen ekstrakorporalne cirkulacije

Jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika za leukaferezu u djece je njihov malen ukupni volumen krvi.[1,15,17] Smanjenje volumena krvi zbog pomaka krvi u ekstrakorporalnu cirkulaciju staničnog separatora može uzrokovati različite vazovagalne reakcije kao što su hipotenzija, tahikardija, bljedoća i znojenje, pa čak i hipovolemički šok. Ove reakcije su češće kod separatora s diskontinuiranim protokom krvi.[9] Stoga većina centara, kao i naš, rabi separatore s kontinuiranim protokom krvi kod kojih se tijekom leukafereze ne događaju velike promjene volumena krvi bolesnika.

Volumen krvi koji se nalazi izvan cirkulacije tijekom leukafereze ovisi o vrsti staničnog separatora. Budući da ekstrakorporalni volumen može biti veći od 40% volumena krvi djeteta, nužno je fiziološku otopinu iskorištenu za punjenje separatora zamijeniti eritrocitnim koncentratom. Ovaj se postupak preporučuje za djecu tjelesne težine manje od 25 kg.[17,18] Neki ga autori preporučuju uvijek kada je ekstrakorporalni volumen veći od 15%, odnosno ako je veći od 25%, a dijete je anemično uz vrijednost hemoglobina manju od 120 g/L.[1,17,19] Za svu djecu tjelesne težine manje od 25 kg fiziološku otopinu u separatoru zamijenili smo koncentratom eritrocita razrijeđenim 5%-tnim albuminom do vrijednosti hematokrita koji je za 10–15% veći od vrijednosti hematokrita bolesnika kako bi se izbjeglo razrjeđenje krvi bolesnika fiziološkom otopinom tijekom samog postupka. U te su djece trajno praćeni vitalni znakovi, no nisu opažene promjene u krvnom tlaku, pulsu ni EKG-u. U literaturi se navodi da se vazovagalne reakcije javljaju u čak 22% male djece, međutim u ovom istraživanju one se nisu javile ni u jednog djeteta.[16]

Vrsta antikoagulansa

Budući da je krv tijekom leukafereze izložena neendotelnim površinama, što dovodi do aktivacije sustava zgrušavanja krvi, tijekom afereze nužna je primjena antikoagulantne otopine. Najčešće se rabi otopina ACD-A. Budući da citrat veže kalcij, a uz to djeca imaju i manji kapacitet metabolizma citrata u jetri, relativno često se mogu javiti simptomi hipokalcemije. Blaži klinički simptomi hipokalcemije u djece su nespecifični, pa se često prepoznaju tek kada dođe do pogoršanja. Stoga primjena citrata kao antikoagulansa u djece zahtijeva pažljiv nadzor tijekom leukafereze kako bi se već nespecifični simptomi, kao što su bol u trbuhu i znojenje ili pak teži, kao što su poremećaj srčanog ritma ili hipotenzija, na vrijeme prepoznali.[1,15,19] Stoga se u našem centru, kao i većini drugih centara, profilaktički primjenjuje kontinuirana infuzija kalcija tijekom postupka. Kalcij je primjenjivan u infuziji 250 mL fiziološke otopine. Na taj je način istodobno nadoknađivan volumen krvi izgubljen prikupljanjem produkta leukafereze. U naših bolesnika, blagi simptomi hipokalcemije javili su se samo tijekom 4 (5,47%) leukafereze, i to samo u starije djece. Učestalost simptoma hipokalcemije bila je manja nego što je opažena u našem prethodnom istraživanju u kojem su se simptomi hipokalcemije javili u 13% odraslih bolesnika, većinom žena manje tjelesne težine.[20] Razlika u učestalosti simptoma hipokalcemije može biti posljedicom primjene grijača za krv, koji je upotrijebljen u sve djece, a što nije bio slučaj u odraslih bolesnika. Klinička i laboratorijska istraživanja su pokazala da hipotermija uzrokuje više metaboličkih poremećaja, a između ostalog i smanjenu razgradnju citrata te da zato hipotermija pridonosi štetnom učinku hipokalcemije.[21] Stoga je moguće je da se grijanjem krvi i smanjenjem rizika od hipotermije, koja se javlja tijekom leukafereze u bolesnika manje tjelesne težine, smanjuje i rizik od pojave simptoma hipokalcemije.[22]

Budući da je u našoj skupini bolesnika rađena leukafereza velikog volumena krvi, kao antikoagulans je uz ACD-A upotrijebljen i heparin. U literaturi se uz primjenu heparina navodi i veća učestalost krvarenja nakon uklanjanja katetera, što nije opaženo ni u jednog našeg bolesnika.[23,24] U djeteta kod kojega je leukafereza prekinuta zbog jakog krvarenja na mjestu ulaza femoralnog katetera, smatramo da to nije bila posljedica primjene heparina, već mehaničkog oštećenja stijenke krvne žile prilikom uvođenja katetera.

Promjene broja stanica u perifernoj krvi

Dobro je poznato da nakon leukafereze u perifernoj krvi bolesnika dolazi do pada broja eritrocita i trombocita.[6–9] Trombocitopenija je najčešća nuspojava leukafereze u djece, a budući da pad broja trombocita ovisi o volumenu procesirane krvi, leukafereze velikog volumena krvi praćene su većim gubitkom trombocita nego leukafereze u kojima se procesira manji volumen krvi.[9] U literaturi se navodi da je medijan gubitka trombocita nakon leukafereze između 36% i 52%, što odgovara i našim rezultatima s medijanom od 43,8%.[16] Smanjenje broja trombocita također je povezano i s brojem trombocita u perifernoj krvi prije leukafereze. Kada je broj trombocita nizak, manji je i postotak gubitka trombocita nego u slučajevima kad je njihov broj normalan. Transfuzije trombocita bile su u našem istraživanju primijenjene samo u 3 bolesnika za koje je planirana leukafereza sljedeći dan, a broj trombocita je nakon prethodne leukafereze bio manji od 30×10^9/L.

Psihološko-socijalne osobitosti

Skupljanje KMS-a iz periferne krvi jest stresna situacija i za dijete i za roditelje.[9] Stoga postupak treba detaljno razjasniti u prvom redu roditeljima, jer će se na taj način smanjiti njihova zabrinutost, a time i stres djeteta. Roditeljima bi trebalo omogućiti boravak uz dijete tijekom cijelog postupka, jer će to pomoći djetetu da se osjeća sigurnije. Važno je da prostor za leukafereze bude prilagođen potrebama djece. Preporučuje se da bude opremljen igračkama, knjigama, televizorom i video-igrama, što sve može pomoći da se djetetu zaokupi pažnja tijekom dugotrajnog postupka afereze. Što se tiče primjene sedativa tijekom postupka afereze, još nema jedinstvenog stava o njihovoj primjeni.[9,22] Naše je iskustvo da je blaga sedacija korisna u male djece, a i u njih samo tijekom prvog postupka skupljanja, radi savladavanja straha od novog prostora, opreme i osoblja odjela.

Zaključak

U djece se postupkom leukafereze mogu uspješno skupljati KMS istim separatorima koji se rabe za odrasle bolesnike. Nuspojave su uglavnom vezane uz venski pristup, metaboličke i hemodinamske promjene. Učestalost tih nuspojava može se smanjiti primjenom tehničkih modifikacija postupka. Rezultati ovog istraživanja, s obzirom na učinkovitost skupljanja i malen broj nuspojava, pokazuju da je leukafereza siguran postupak koji može uspješno nadomjestiti skupljanje KMS-a vađenjem koštane srži.

LITERATURA

1. *Diaz MA, Kanold J, Vincent MG, Halle P, Madero L, Demeocq F*. Using peripheral blood progenitor cells for transplantation in pediatric patients: a state-of-the-art review. Bone Marrow Transplant 2000;26: 1291–8.
2. *Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I*. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother 1996;5(3):213–26.
3. *Stanović S, Boranić M, Petrovečki M i sur*. Thiorphan stimulates clonal growth of GM-CFU in short-term cultures of bone marrow from a healthy donor and from patients with non-Hodgkin lymphoma. Biomed Pharmacother 1998;52(9):397–402.
4. *Lasky LC, Bostrom B, Smith J i sur*. Clinical collection and use of peripheral blood stem cells in pediatric patients. Transplantation 1989;47: 613–6.
5. *Takaue Y, Watanabe T, Kawano Y i sur*. Isolation and storage of peripheral blood hematopoietic stem cells for autotransplantation into children with cancer. Blood 1989;74:1245–51.
6. *Demeocq F, Kanold J, Chassagne J i sur*. Successful blood stem cell collection and transplant in children weighing less than 25 kg. Bone Marrow Transplant 1994;13:43–50.
7. *Takaue Y, Kawano Y, Abe T i sur*. Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighting 20 kg or less. Blood 1995;86:372–80.
8. *Delgado J, Fernandez-Jimenez MC, Martinez A i sur*. Analysis of factors affecting PBPC collection in low-weight children with malignant disorders. Cytotherapy 2004;6:43–9.
9. *Sevilla J, Diaz MA, Fernandez-Plaza S i sur*. Risk and methods for peripheral blood progenitor cell collection in small children. Transf Sci 2004;31:221–31.
10. *Diaz MA, Vincent MG, Garcia-Sanchez F, Vicario JL, Madero L*. Long-term hematopoietic engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in pediatric patients: effects of the CD34+ cell dose. Vox Sang 2000;79:145–50.
11. *Kawano Y, Takaue Y, Watanabe T i sur*. Efficacy of the mobilization of peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in pediatric donors. Cancer Res 1999;59:3321–4.
12. *Gonzalez M, Benito A, Diaz MA, Madero L*. Peripheral blood progenitor cell collection by large-volume leukapheresis from pediatric donors. Bone Marrow Transplant 1999;23:631–3.
13. *De la Rubia J, Diaz MA, Verdeguer A i sur*. Donor age-related differences in PBSC mobilization with rHuG-CSF. Transfusion 2001;41: 201–5.
14. *Murata M, Harada M, Kato S i sur*. Peripheral blood stem cell mobilization and apheresis: analysis of adverse events in 94 normal donors. Bone Marrow Transplant 1999;24:1065–71.
15. *Marson P, Petris MG, De Silvestro G*. Collection of peripheral blood stem cells in pediatric patients: a concise review on technical aspects. Bone Marrow Transplant 1998;22(Suppl. 5):S7–S11.
16. *Sevilla J, Gonzalez-Vincent M, Madero L, Garcia-Sanchez F, Diaz MA*. Large volume leukapheresis in small children: safety profile and variables affecting peripheral blood progenitor cell collection. Bone Marrow Transplant 2003;31:263–7.
17. *Galacki DM*. An overview of therapeutic apheresis in pediatrics. J Clin Apheresis 1997;12:1–3.
18. *Gorlin JB, Humphereys D, Kent P i sur*. Pediatric large volume peripheral blood progenitor cell collections from patients under 25 kg: a primer. J Clin Apheresis 1996;11:195–203.
19. *Gorlin JB*. Therapeutic plasma exchange and cytapheresis in pediatric patients. Transf Sci 1999;21:21–36.
20. *Golubić Ćepulić B, Bojanić I, Plenković F i sur*. Adverse events in collection of peripheral blood hematopoietic progenitor cells during five year period. Bone Marrow Transplant 2000;25(Supp l):877.
21. *Dzik WH, Kirkley SA*. Citrate toxicity during massive blood transfusion. Transfus Med Rev 1988;2:76–94.
22. *Rogers RL, Cooling LLW*. Therapeutic apheresis in pediatric patients. U: McLeod BC, Price TH, Weinstein R, ur. Apheresis: Principles and practice. Bethesda: AABB Press; 2003, str. 477–92.
23. *Sevilla J, Gonzalez-Vincet M, Fernandez-Plaza S i sur*. Heparin based anticoagulation during peripheral blood stem cell collection may increase the CD34+ cell yield. Haematologica 2004;89:249–51.
24. *Bolan CD, Yau YY, Cullis HC i sur*. Pediatric large-volume leukapheresis: a single institution experience with heparin versus citrate-based anticoagulant regimens. Transfusion 2004;44:229–38.

UPALNE BOLESTI CRIJEVA I TRUDNOĆA

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND PREGNANCY

MARKO DUVNJAK, IVAN LEROTIĆ, VEDRAN TOMAŠIĆ, TAJANA PAVIĆ, LUCIJA VIROVIĆ*

Deskriptori: Upalne bolesti crijeva – farmakoterapija; Trudnoća, komplikacije – farmakoterapija; Ishod trudnoće

Sažetak. Upalne bolesti crijeva (engl. inflammatory bowel disease – IBD) često se javljaju kod žena u reproduktivnoj dobi. Zbog toga se javlja niz nedoumica vezanih uz nasljednost IBD-a, mogućnost začeća, utjecaj trudnoće na IBD, utjecaj IBD-a na trudnoću te sigurnost različitih lijekova. Treba posebno naglasiti da ishod trudnoće u najvećoj mjeri ovisi o aktivnosti bolesti u trenutku začeća i da bolest koja je u remisiji ne povećava rizik od nepovoljnih ishoda trudnoće. Zbog toga bi trudnoću trebalo planirati u vrijeme remisije bolesti, a aktivnu bolest u trudnoći energično liječiti. Uz nekoliko iznimaka većina lije-

* **Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica »Sestre milosrdnice«** (prof. dr. sc. Marko Duvnjak, dr. med.; Ivan Lerotić, dr. med.; Vedran Tomašić, dr. med.; Tajana Pavić, dr. med.; Lucija Virović, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. M. Duvnjak, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinika za unutarnje bolesti Kliničke bolnice »Sestre milosrdnice«, Vinogradska 29, 10 000 Zagreb

Primljeno 13. prosinca 2004., prihvaćeno 30. kolovoza 2005.