

## Pripravki granulocitov in priporočila za njihovo uporabo

Granulocyte concentrates and guidelines for their clinical use

Dragoslav Domanović,<sup>1</sup> Marko Cukjati,<sup>1</sup> Samo Zver<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za preskrbo s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Klinični oddelek za hematologijo, Interne klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

dr. Dragoslav Domanović,  
spec. dr. med. Oddelek za  
preskrbo s krvjo, Zavod  
Republike Slovenije za  
transfuzijsko medicino,  
Štajmerjeva 6,  
1000 Ljubljana  
Tel.: +386 1 5438123  
e.mail: dragoslav.  
domanovic@ztm.si

### Ključne besede:

nevtrofilni granulocit,  
pripravek granulocitov,  
afereza, rastni dejavnik  
za celice granulocitne  
vrste

### Key words:

neutrophyl granulocyte,  
granulocyte concentrate,  
apheresis, granulocyte  
colonies stimulatory  
growth factor

### Izveleček

Pripravek granulocitov (PG) je eden zadnjih možnih terapevtskih ukrepov pri bolnikih s hudo nevtropenijo, ki se ne odzivajo na predhodno antibiotično in antimikotično zdravljenje širokega učinkovanja. Ker je uporaba PG v zadnjih letih zaradi hkratne uporabe ravnega dejavnika za celice granulocitne vrste (G-CSF) dostopnejša in predvsem bolj učinkovita, se v vsakdanji klinični praksi vse pogosteje odločamo zanj. Zato je prav, da poznamo sodobna stališča o tej komponenti krvi. V članku predstavljamo postopek zbiranja, obdelave in zdravljenja s PG.

### Uvod

Nevtrofilni granulociti (NG) nastajajo z diferenciacijo in dozorevanjem krvotvornih matičnih celic v kostnem mozgu. Kljub temu, da se tam zadržujejo različno dolgo, znaša stalna zaloga NG v kostnem mozgu približno  $9 \times 10^9$  NG/kg telesne mase (TM) posameznika.<sup>10</sup> Iz kostnega mozga prehaja v sistemski krvni obtok  $16,3 \times 10^8$  NG/kgTM/dan. Tam se razporedijo v osrednji cirkulirajoči del (40 %) in marginalni periferni del (60 %), ki sta v dinamičnem ravnovesju. Na njuno razmerje lahko vplivamo z zdravili, npr. s kortikosteroidi. Pod vplivom različnih citokinov preide po 6 urah polovica NG iz krvnega obtoka skozi endotel krvnih žil v tkiva, kjer jih po

### Abstract

The use of granulocyte concentrate (GC) is usually the last therapeutic approach in patients with severe neutropenia, unresponsive to treatment with wide spectrum antibiotics and antimycotics. Because of the routine usage of granulocyte colony-stimulating factor, this therapeutic approach is nowadays more and more frequent and more effective. Therefore it is necessary to have an updated knowledge of this blood component. In the article, we present the whole process from collection and processing to treatment with GC.

dveh do treh dneh fagocitirajo celice retikuloendotelnega sistema.<sup>10</sup>

Poglavitna vloga NG je sodelovanje v obrambi človeškega telesa pred okužbami. NG lahko ubije bakterije, glive in plesni s fagocitozo, s sproščanjem mikrobicidnih snovi v okolico ter s sproščanjem nukleinskih kislin in beljakovinskih verig, ki ujamejo mikroorganizme v past (*angl.* neutrophyl extracellular traps, NET).<sup>1</sup> Zato se pri hudih oblikah nevtropenije (število NG, manjše od  $0,5 \times 10^9$ /L), ki spremljajo mieloablativno zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali brez nje ter pri nekaterih funkcionalnih motnjah NG, pojavljajo klinično težke, za bolnika pogosto usodne okužbe. Zdravimo jih z antibiotiki in antimikotiki

**Citirajte kot/Cite as:**

Zdrav Vestn 2011;  
80: 439–450

Prispelo: 19. jan. 2011,  
Sprejeto: 21. jan. 2011

Priporočila so bila sprejeta na rednem skupnem srečanju združenja hematologov in transfuziologov Slovenije, 15. in 16. 10. 2010 na Bledu.

ter z ustrežno podporno nego. V primeru neodzivnosti na omenjeno zdravljenje lahko uporabimo transfuzijo pripravkov granulocitov (PG). PG so komponenta krvi, pripravljena z aferezo iz krvi enega darovalca, ki vsebuje funkcionalne NG, suspendirane v plazmi. V pripravku so v manjšem deležu kot v polni krvi prisotni tudi eozinofilni in bazofilni granulociti ter ostale krvne celice, kar moramo upoštevati pri transfuziji.<sup>1,2,3</sup> Zato so to komponento krvi poimenovali PG, kljub temu, da jo uporabljamo kot vir NG za nadomestno zdravljenje s transfuzijami.<sup>4</sup>

## Zgodovina zdravljenja z NG

Od 60. let prejšnjega stoletja, ko so prvič zbrali NG z ločevanjem levkocitno-trombocitne plasti (LTP) iz krvi darovalcev s kronično mieloično levkemijo (KML), se je pogostost klinične uporabe PG spreminjala.<sup>5</sup> V začetku so s transfuzijo takšnega pripravka dosegli povečanje števila NG v krvi nevtropeničnih bolnikov, kar je pri polovici bolnikov tudi prehodno izboljšalo klinično stanje. Ker so v kostnem mozgu tako zdravljenih bolnikov zaznali za KML značilne celice s translokacijo genetskega materiala med kromosomoma 9 in 22 (t(9; 22)),<sup>6</sup> so takrat ocenili, da postopek zdravljenja s PG ni sprejemljiv.

Z odkritjem afereznega postopka leta 1965 se je ponudila možnost zbiranja večjega števila NG tudi od povsem zdravih darovalcev, kar je povečalo klinično uporabo transfuzij PG. V Tabeli 1 prikazujemo izsledke starejših kliničnih raziskav učinkovitosti transfuzij PG nevtropeničnim bolnikom z okužbami.<sup>7</sup> Raziskave so pokazale, da je tovrstno zdravljenje lahko učinkovito, vendar je bila njihova dokazna moč slaba zaradi praviloma majhnega števila bolnikov, ki so bili pogosto tudi skrbno izbrani, zaradi heterogenosti vključitvenih meril, razlik v sestavi PG in drugih pomanjkljivosti.<sup>7</sup>

Temu obdobju je sledilo obdobje ponovnega zmanjšanja klinične uporabe zaradi izboljšane zdravljenja z novimi antibiotiki in antimikotiki ter vse bolj učinkovitega podpornega zdravljenja. K zmanjšanju transfuzij PG so pripomogli tudi relativno

pogosti, celo življenje ogrožajoči neželeni učinki (predvsem na dihalih) po transfuziji PG in nezadostna klinična učinkovitost zdravljenja zaradi majhnega števila in apoptoze NG v pripravkih.

V drugi polovici 90. let prejšnjega stoletja so odkrili rastni dejavnik za celice granulocitne vrste (G-CSF; filgrastim).<sup>8</sup> Njegova klinična uporaba je najprej zmanjšala potrebo po transfuzijah PG, saj se je skrajšalo trajanje hude nevtropenije po zdravljenju s citostatiki (bolniki z akutnimi oblikami levkemije in mielodisplastičnim sindromom; bolniki, zdravljeni s presaditvijo krvotvornih matičnih celic). Konec 20. stoletja pa so transfuzije PG ponovno postale aktualne. Stimulacija zdravih darovalcev z rastnim dejavnikom G-CSF namreč omogoča zbiranje velikega števila NG med posameznim afereznim postopkom in s tem njihov večji ter predvsem učinkovitejši terapevtski odmerek.<sup>9</sup>

Tudi v Sloveniji smo zabeležili podobno gibanje letnega števila granulocitaferez. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino zbiramo PG z granulocitaferezami od leta 1981. V obdobju 1990–2010 smo opravili 214 zbiranj PG, kar je v povprečju nekaj več kot 10 zbiranj na leto. Povečano povpraševanje po PG ugotavljamo od leta 2008, kar sovpada z že opisanim načinom stimulacije darovalcev s kombinacijo ravnega dejavnika G-CSF in kortikosteroidov. Največ zbiranj (32) smo zabeležili leta 2010 (Slika 1).

## Priporočilo: Izvajalci

**Zdravljenje s pripravki granulocitov izvajajo hematologi ali specialisti druge stroke v sodelovanju s hematologi. Zbiranje granulocitov poteka v transfuzijskih ustanovah, ki so usposobljene za takšen odvzem. Hematolog obvesti transfuziologa o potrebi zdravljenja s transfuzijami granulocitov.**

## Indikacije za zdravljenje s PG

Indikacije za zdravljenje s transfuzijami PG so lahko terapevtske ali profilaktične. Terapevtske transfuzije so indicirane pri zdravljenju okužb bolnikov s hudo nev-

tropenijo, ki se ne odzivajo na zdravljenje z antimikrobnimi zdravili.<sup>44</sup> Profilaktične transfuzije PG so indicirane za sekundarno profilakso pri bolnikih, ki so imeli hude bakterijske ali glivične okužbe in potrebujejo nadaljevanje citostatskega zdravljenja oz. presaditev krvotvornih matičnih celic.<sup>45,46</sup> Ključne učinke profilaktičnih transfuzij PG še raziskujejo.

Terapevtske transfuzije NG so lahko način zdravljenja pri bolniku s hudo nevtropenijo, ki ima hkrati tudi bakterijsko ali glivično okužbo (pogosto pa kar obe), ki se ne odzivata na zdravljenje z antibiotiki ali antimikotiki. Ob tem je pričakovano obdobje nevtropenije daljše od 7 dni.<sup>47</sup> Zdravljenje s transfuzijami NG je na mestu tudi v primeru invazivne glivične okužbe in neonatalne sepse. Pri slednji je problem nezrela in omejena granulopoeza. Bakterijska sepsa se pojavlja pri novorojenčkih z incidenco 1–10 primerov/1000 novorojencev in lahko pomeni tudi 20 % umrljivost.<sup>22</sup> Ta lahko doseže celo 100 %, če ima sepsa nedonošenček, stanje pa povzroča sev streptokoka skupine B.<sup>22</sup> Načeloma je mogoče s transfuzijami NG zdraviti tudi nekatere prirojene funkcionalne motnje NG (kronična granulomatozna bolezen, pomanjkanje encima mieloperoxidaza, Chediak-Higashijev sindrom idr.) in številne bolezni NG (kronična idiopatska nevtropenija odraslih, ciklična nevtropenija idr.), vendar o tem zaenkrat v literaturi ni pomembnih poročil.

### Priporočila: Indikacije

Pripravke granulocitov lahko uporabljamo le v terapevtske namene pri nevtropeničnih bolnikih, ki izpolnjujejo VSE izmed naslednjih pogojev:

- huda nevtropenija  $< 0,5 \times 10^9/L$ ;
- pozitivna hemokultura ali kužnina s sterilnega mesta na bakterije ali glivice;
- naprednejša okužba parenhima, odprta na zdravljenje z antibiotiki;
- mieloidna hipoplazija;
- verjetnost za povrnitev funkcije kostnega mozga.

Bolniki z dokazano funkcijsko motnjo granulocitov (kot je kronična granulomatozna bolezen) ali z neonatalno sep-

so, ki imajo nevtropenijo zaradi izčrpane granulocitne rezerve v kostnem mozgu, lahko prejmejo pripravke granulocitov v primeru življenje ogrožujočih okužb ali med čakanjem na presaditev krvotvornih matičnih celic.

### Terapevtski odmerek PG

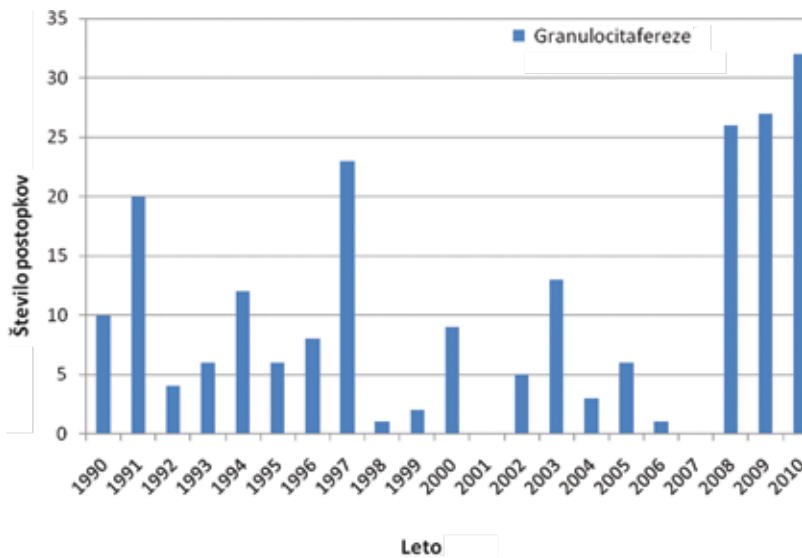
Cilj zdravljenja s transfuzijami PG je, da z dnevnimi odmerki NG dosežemo vrednost NG v periferni krvi bolnika, ki je večja od  $0,5 \times 10^9/L$ . To je tudi mejna vrednost, ki označuje hudo (kritično) nevtropenijo. Če je le mogoče, je zelena ciljna vrednost NG čim bližje normalnim vrednostim NG. Tako dosežemo primerno zaščito bolnikov pred okužbami, ki se sicer vedno pojavljajo v obdobju podaljšane kritične nevtropenije. Če se za zdravljenje odločimo, moramo bolnika zdraviti s transfuzijami NG vsak dan z odmerkom  $1,5\text{--}3,0 \times 10^8$  NG na kg TM odraslega prejemnika.<sup>4</sup> Zdravimo najmanj štiri zaporedne dni oz. dokler se ne vzpostavi zadostna lastna bolnikova granulopoeza. Pri novorojenčkih s sepsa moramo zagotoviti terapevtski odmerek, večji od  $1 \times 10^9$  NG/kgTM/dan.<sup>4</sup>

### Priporočilo: Odmerjanje

**Priporočeni odmerek je večji od  $1 \times 10^{10}$  granulocitov na dan (oziroma  $1,5\text{--}3,0 \times 10^8$  NG/kgTM/dan pri odraslem prejemniku) vsaj 4 dni zapored (novorojenčki  $> 1 \times 10^9$  NG/kgTM/dan).**

### Načini priprave PG

V praksi še vedno uporabljamo dva načina priprave PG: z diferencialnim centrifugiranjem polne krvi več krvodajalcev in z granulocitaferezo iz krvi enega darovalca. Pri prvem načinu iz 10 enot polne krvi krvodajalcev osamimo LTP in jih transfundiramo bolnikom kot vir NG. Zaradi večjega volumna, velikega števila trombocitov in eritrocitov ter majhnega izplena NG so takšni pripravki manj učinkoviti, neželeni učinki pa pogosti. Z alternativnim postopkom lahko zlijemo dvakrat po pet enot LTP in po ponovnem centrifugiranju iz zlitij osa-



**Slika 1:** Letno število granulocitaferez v Sloveniji v obdobju 1990–2010.  
\*Podatki o letnem številu granulocitaferez so iz dokumentacije Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

mimo plast LTP. Na ta način dosežemo večji izplen NG, manjši volumen ter manjše število eritrocitov in trombocitov v pripravku. Z granulocitaferezo stimuliranih darovalcev zberemo PG, ki imajo v primerjavi z drugimi načini priprave največ NG z najmanjšim volumnom in s številom preostalih krvnih celic, zato se za ta način odločamo tudi pri nas (Tabela 2).

### Izbira primernih darovalcev NG

Darovalci PG so lahko zdrave osebe, stare 18–65 let, ki izpolnjujejo splošna merila za dajanje krvi in krvnih komponent. V obdobju pred stimulacijo z G-CSF so bili darovalci PG praviloma krvodajalci, ki so že dajali komponente krvi z aferezami (npr. s trombocitaferezo ali plazmaferezo) in so bili postopka vajeni. Možnost nastanka nekaterih zapletov ob odvzemu je bila tako manjša, uspešnost zbiranja pa večja. V obdobju stimulacije darovalcev z G-CSF pa praviloma darovalce iščemo med sorodniki oz. med prijatelji ali znanci potencialnega prejemnika. Za dajanje PG jih namreč lažje motiviramo kot naključne darovalce, ker želja pomagati sorodniku ali prijatelju odtehta tveganje, povezano z neželenimi učinki, ki lahko nastanejo po prejemanju G-CSF ali pri aferezi sami. Klinični podatki kažejo, da glede terapevtske učinkovitosti ni pomembnih razlik med PG, pridobljenimi od sorodnih ali nesorodnih darovalcev.<sup>17</sup>

Če je prejemnik PG kandidat za zdravljenje s presaditvijo alogenskih krvotvornih

matičnih celic (KMC), se odločamo za nesorodne darovalce (prijatelje ali znance prejemnika). Zaradi možnosti alosenzibilizacije prejemnika na dajalčve antigene HLA uporaba PG, zbranih od sorodnikov, zmanjša verjetnost, da med bolnikovimi sorodniki najdemo ustreznega darovalca KMC.

Na podlagi znane krvne skupine AB0 in RhD prejemnika nato izberemo potencialne darovalce, ki imajo krvno skupino, ki je identična ali skladna s krvno skupino prejemnika. Celična membrana NG sicer ne vsebuje antigenov AB0 in RhD, zato njihova skladnost ne vpliva na preživetje NG po transfuziji.<sup>11,12</sup> Skladnost v krvnih skupinah AB0 in RhD med prejemnikom in dajalcem moramo zagotavljati zaradi sorazmerno velikega deleža eritrocitov v PG. Zato so načela AB0 in RhD skladnosti med prejemnikom in dajalcem PG enaka kot pri transfuziji eritrocitov.

Pred izbiro darovalce vedno informiramo o vseh vidikih darovanja PG in možnih zapletih ter pridobimo ciljano anamnezo glede kroničnih bolezni, predvsem bolezni srca, obtočil ali dihal kot tudi rakavih bolezni in bolezni, ki se prenašajo s krvjo.

Izbrane darovalce testiramo na prisotnost označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo v predpisanem obsegu (HbsAg, anti-HCV, anti-HIV in anti Lues ter NAT HBV DNA, HCV DNA ter HIV RNA)<sup>13</sup> že dan pred afereznim postopkom, s čimer se izognemo shranjevanju PG po odvzemu zaradi čakanja na izsledke testiranj in posledičnemu propadanju NG v pripravku. Poseben pomen ima »citomegalovirusni (CMV) status« bolnika in darovalca. NG lahko vsebujejo CMV v latentni neaktivni obliki, ki ga lahko prenesemo s transfuzijami PG prejemniku, neprekuženemu s CMV).<sup>14</sup> Kljub temu, da nekatere novejšje raziskave niso dokazale povezave med statusom CMV darovalca in incidenco reaktivacije CMV oz. razvoja bolezni pri prejemniku PG,<sup>15,16</sup> se pri zdravljenju s transfuzijami PG upoštevamo skladnost CMV med prejemnikom in darovalcem. To pomeni, da moramo določiti prisotnost anti-CMV protiteles (IgG in IgM) v krvi darovalca in prejemnika PG pred zbiranjem in prejemniku transfundirati CMV-skladne PG, kar upoštevamo tudi v

Sloveniji. V primeru, da je prejemnik CMV-seronegativen, moramo zagotoviti, da je CMV-seronegativen tudi darovalec PG. Ker je večina populacije že prekužena s CMV,<sup>14</sup> so takšni primeri redki.

Skladnost med prejemnikom in darovalcem v antigenih HLA in HNA je potrebna le v primeru, da je prejemnik nanje senzibiliziran. V takih primerih lahko pride pri senzibiliziranemu prejemniku do vročinskih reakcij ali celo pljučne prizadetosti v obliki nekardiogenega pljučnega edema in hitrejšega izločanja transfundiranih NG iz krvnega obtoka. Zato prejemnike NG vedno vprašamo o morebitnih predhodnih transfuzijah, nosečnostih oziroma vročinskih reakcijah ali drugih neželenih učinkih, ki so bili vezani na predhodne transfuzije krvnih pripravkov. Če je anamneza pozitivna, potem takšne bolnike dodatno testiramo na prisotnost protiteles anti-HLA ali anti-HNA in določimo njihovo specifičnost. V primeru prisotnosti omenjenih protiteles opredelimo pri darovalcih vrsto prisotnih antigenov HLA in HNA ter izberemo tistega, ki antigenov, proti katerim so naperjena prejemnikova protitelesa, nima.<sup>17</sup>

### Priporočilo: Motiviranje in nabor krvodajalcev

**Granulocite zbiramo od usmerjenih krvodajalcev, ki so bolnikovi sorodniki ali znanci, zaradi njihove večje motiviranosti in pripravljenosti, da pristanejo na jemanje rastnih dejavnikov. Možne darovalce zagotovijo sorodniki na predlog hematologa, ki jih napoti na določitev krvne skupine AB0 in RhD ter Kell ter anti-CMV. Na podlagi izvidov izberemo ustrezne darovalce. Če je prejemnik PG kandidat za zdravljenje z presaditvijo alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC), se odločamo za nesorodne darovalce (prijatelje ali znance prejemnika).**

### Stimulacija darovalcev NG

Učinkovitost zbiranja NG lahko povečamo z dajanjem kortikosteroidov in/ali rastnega dejavnika G-CSF darovalcem pred postopkom zbiranja. Kortikosteroidi delu-

jejo na izplavljanje granulocitov iz zaloga v kostnem mozgu v krvni obtok, v krvnem obtoku pa na prehod granulocitov iz marginalnega poola v centralni. Z dajanjem 60 mg prednizona ali 5 mg deksametazona peroralno v enkratnem odmerku povečamo koncentracijo granulocitov v krvi za 2- do 3-krat.<sup>11</sup> Z dajanjem rastnega dejavnika G-CSF zdravemu darovalcu sprožimo prehod NG iz zaloga v kostnem mozgu v periferni krvni obtok ter stimuliramo proliferacijo in dozorevanje nezrelih prekurzorjev NG.<sup>18</sup> Hkrati G-CSF poveča tudi fagocitno sposobnost NG in tako tudi njihovo baktericidno in fungicidno aktivnost, pospeši metabolno odzivnost NG na sekundarne agoniste, poveča izraženost adhezijskih molekul na membrani ter zavira apoptozo NG, kar lahko pojasni podaljšano razpolovno dobo transfundiranih NG.<sup>19-22</sup> Zvečanje števila NG v periferni krvi darovalca je največje 12 ur po dajanju G-CSF. Raziskave so pokazale, da dajanje G-CSF v odmerku 300 µg sc. poveča koncentracijo NG v krvi za 7-krat, kombinacija deksametazona v odmerku 8 mg p.o. in G-CSF v odmerku 300 µg za 9-krat, ter v kombinacija deksametazona 8 mg p.o. in G-CSF v odmerku 600 µg pa kar za 11-krat.<sup>23</sup> Največji porast števila granulocitov v krvi po enkratnem odmerku G-CSF smo ugotovili po 12 urah.<sup>33</sup> Pričakovani izplen NG/aferezo je v tem primeru 50–70 x 10<sup>9</sup> NG, kar je nekajkrat več kot brez stimulacije z omenjenima zdraviloma.<sup>24</sup>

### Priporočilo: Priprava darovalca

G-CSF lahko prejme darovalec na hematološki kliniki ali pa ga usposobimo za samodajanje na domu. Ker zbiranje NG z aferezo izvajamo zjutraj, priporočamo, da si darovalec vbrizga G-CSF v odmerku 5–10 µg/kg sc. (Neupogen® 300–480 µg sc.) okoli 22.00 ure zvečer, dan pred aferezo. Hkrati darovalec vzame tudi tableto metilprednizolona (Medrol®) 48 mg. Hematolog predpiše darovalcu recept za Medrol 48 mg.

**Tabela 1:** Uspešnost zdravljenja s transfuzijami PG pri nekaterih bolezenskih stanjih.

Vrsta okužbe	N	Uspešnost zdravljenja (%)
bakterijska sepsa	206	62
sepsa, neznani povzročitelj	39	46
pljučnica, neznani povzročitelj	11	64
invazivna gljivična okužba	77	36
lokalizirana okužba	47	83
nespecificirana vročica	85	75

Tabela je pripravljena na podlagi podatkov iz poglavja v knjigi (5) in predstavljajo uspešnost zdravljenja s pripravki granulocitov, objavljenih v 34 člankih. N= število zdravljenih bolnikov.

## Zbiranje NG s postopkom afereze

Zbiranje NG s celičnimi ločevalci imenujemo granulocitafereza, ki je lahko filtracijska ali centrifugacijska. V klinični praksi filtracijskega načina ne uporabljamo več, ker je bilo delovanje tako zbranih NG okrnjeno, med postopkom afereze pa je prihajalo tudi do aktiviranja komponent komplemента s posledičnimi hudimi neželenimi učinki in granulocitopenijo pri darovalcih. Pri centrifugacijskih levkocitaferezah NG ločujemo od ostalih krvnih celic z diferencialnim centrifugiranjem. Praviloma se med levkocitaferezo v aferezni napravi obdela 7–10 litrov darovalčeve krvi (oz. dvakratni volumen krvi), kar traja približno 3–4 ure. Večja začetna vrednost števila trombocitov in NG v krvi darovalca pred dajanjem G-CSF in kortikosteroida pomeni večjo učinkovitostjo zbiranja.<sup>25</sup>

Pred zbiranjem darovalca seznanimo z vsemi dejstvi, ki so povezana s postopkom, pregledamo izpolnjen medicinski vprašalnik o sedanjem zdravstvenem stanju in preteklih boleznih, o potovanjih v tujino ter tveganem vedenju, nato določimo hemogram in koncentracijo hemoglobina v krvi bolnika, izmerimo krvni tlak in srčno frekvenco in ga po potrebi tudi fizikalno pregledamo. Po preverjanju izsledkov določanja označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo, zaključimo izbiro darovalca z njegovo podpisano izjavo o poučenosti in s pristankom na odvzem PG.

V postopku afereze odvzeti krvi dodajamo sedimentacijsko sredstvo, najpogosteje hidroksietilni škrob (HES), s katerim dosežemo do 50-odstotni izplen NG. Sedimentacijsko sredstvo ima v postopku afereze dvojni učinek: pospeši zlepljanje eritrocitov, njihovo posedanje med centrifugiranjem in poveča viskoznost plazme. Zato se pri aferezi boljše loči plast NG od plasti eritrocitov v odvzeti krvi. To omogoča, da zberemo večje število NG z manjšim deležom eritrocitov kot s postopki brez uporabe sedimentacijskega sredstva. Učinek HES je odvisen od velikosti molekul v pripravku. Pri uporabi visokomolekularnega HES 450/0,7 je bila učinkovitost postopka za 142 % večja, v pripravku pa je bilo 35 % manj eritrocitov kot v postopkih z uporabo HES 200/0,5.<sup>26</sup>

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino smo za zbiranje NG uporabljali dve napravi: CS-3000 (Baxter Healthcare, Deerfield IL, ZDA) in Cobe Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO). Kot sedimentacijsko sredstvo smo v preteklosti uporabljali visokomolekularni Dextran 70. Ker ga na tržišču ni več in so ga nadomestile druge, varnejše koloidne raztopine (brez neželenih učinkov v smislu anafilaktičnih dogodkov), zdaj uporabljamo 6-odstotno raztopino HES 130 (Voluven®). Pri uporabi Dextrana 70 je bila mediana števila NG v pripravku  $8,5 \times 10^{10}$  (CS-3000) in  $7,7 \times 10^{10}$  (Cobe Spectra). Z uporabo HES 130 (Voluven®) smo zbrali sicer manj NG (mediana =  $3,8 \times 10^{10}$ ) kot pri uporabi visokomolekularnega dekstrana, vendar še vedno značilno več kot pri aferezni postopki brez sedimentacijskega sredstva, ko je bilo NG v pripravku najmanj (mediana =  $2,2 \times 10^{10}$ ) (Tabela 2). Postopek z uporabo HES 130 je mogoče še nadalje optimizirati z različnimi nastavitvami ločevanja na napravi. V PG, zbranih na napravi Cobe Spectra, je bilo manj eritrocitov, zlasti ko smo za pospeševanje sedimentacije uporabili HES (Ht 0,14). Volumen pripravka (mediana = 267 ml) je bil večji kot pri napravi CS-3000 (mediana = 200 ml).

**Tabela 2:** Lastnosti različnih pripravkov granulocitov\*.

Parameter	10 TLP	Zlitje 10 TLP (povprečje, SD)	Stimulirano zbiranje z aferezo (mediana, razpon)
volumen (ml)	590	207 (12)	299 (214–333)
nevtrofilci ( $10^{10}/E$ )	1,05	1,0 (0,3)	6,37 (3,69–8,47)
hematokrit (%)	45	15 (5)	9 (7–20)
limfociti ( $10^9/E$ )	8,80	6,72 (0,75)	N/A
monociti ( $10^9/E$ )	1,80	1,22 (0,37)	N/A
trombociti ( $10^9/E$ )	750	499 (112)	160 (82–293)
eritrociti ( $10^{12}/E$ )	2,70	0,57 (0,06)	0,3 (0,28–0,61)

Legenda:

TLP = trombocitno-levkocitna plast

SD = standardni odklon

E = enota

Tabela je prirejena po: Granulocyte Therapy, Joint UKBTS / HPA Professional Advisory Committee, Position Statement; <http://www.transfusionguidelines.org.uk>

### Priporočila: Odvzem NG s postopkom afereze

**Odvzem granulocitov izvedemo z levkocitaferozo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Darovalec mora pred postopkom podpisati izjavo o poučenosti in pristanek na odvzem. Za učinkovitejšo ločevanje celic je potrebna uporaba hidroksietilnega škroba, nizkomolekularnega dekstrana ali tekoče želatine. Količina sedimentacijske snovi je odvisna od uporabljenih tehnologij zbiranja PG.**

**Ob vsakem odvezmu pri darovalcu opravimo naslednje preiskave: določitev krvne skupine AB0, RhD in Kell; serološko testiranje in testiranje NAT na HBV, HBC in HIV ter serološko testiranje na sifilis. Testiranje na CMV opravimo po naročilu lečečega zdravnika.**

### Pogostost zaporednih odvzemov NG

Pogostost zaporednih odvzemov PG pri enem darovalcu je omejena, merila pa so različna. V zahodni Evropi je v veljavi omejitev, vezana na največji dovoljeni volumen HES, ki ga lahko prejme darovalec PG. Ta znaša 500 ml na odvzem oziroma celokupni kumulativni volumen 2000 ml v enem letu.<sup>27</sup> Poskusi z dajanjem 10-odstotnega pentaškroba, ki se hitreje izloča iz telesa

kot HES, so pokazali njegovo manjšo učinkovitost.<sup>28</sup> Nekateri omejujejo tudi največji dovoljeni odmerek prednizolona, ki znaša 200 mg v letu dni. Pogostost odvzemov se razlikuje tudi glede na vrsto darovalcev. Pri usmerjenih darovalcih (znanci in sorodniki) je dopustno večkratno dajanje NG v krajših časovnih presledkih. V Sloveniji menimo, da zdrav usmerjen darovalec lahko opravi aferezo NG enkrat v tednu dni, največ tri zaporedne tedne. Zato za postopek darovanja NG praviloma vedno pripravimo 7–10 primernih darovalcev, ki jih nato lahko kličemo največ trikrat zapored v časovnem razmiku 5–10 dni. Pri naključnih krvodajalcih je omejitev praviloma strožja (od enkrat do trikrat v življenju) in je odvisna od zakonodaje v posamezni državi.<sup>29</sup> Večkratni zaporedni odvzemi NG lahko vplivajo na odzivnost darovalčevega kostnega mozga na ponovno stimulacijo z rastnim dejavnikom G-CSF. Pri darovalcih, ki so darovali PG več kot dvajsetkrat, je bilo število NG po stimulaciji z G-CSF v povprečju za  $6 \times 10^9$  manjše od števila NG pred prvim odvzemom.<sup>29</sup>

### Priporočilo: Pogostost zaporednih odvzemov NG

**Pri usmerjenih in naključnih darovalcih NG lahko opravimo postopek afereze do trikrat v presledku 5 do 10 dni med posameznima postopkoma.**

**Tabela 3:** Nekatere lastnosti PG in učinkovitost njihovega zbiranja z aferizo glede na uporabljeni celični ločevalec in sedimentacijsko sredstvo.

Celični ločevalec	Sedimentacijsko sredstvo	Nevtrofilci (x10e10/PG)*	Hematokrit	Volumen (ml)	Učinkovitost zbiranja (%)
CS-3000 (N=12)	Dextran 70	8,5 (3,6–13,0)	0,23 (0,14–0,33)	200 (200–200)	37,0 (21,6–45,7)
Cobe spectra (N=8)	Dextran 70	7,7 (5,6–13,8)	0,19 (0,10–0,30)	273 (229–317)	38,1 (33,6–76,8)
Cobe spectra (N=4)	0	2,2 (1,3–2,8)	0,28 (0,23–0,36)	269 (251–308)	12,0 (10,1–19,5)
Cobe Spectra (N=5)	HES	3,8 (2,8–6,7)	0,14 (0,10–0,18)	267 (235–305)	25,1 (18,5–35,1)

Legenda: \*Izsledki so prikazani kot mediana z razponom; PG = pripravek granulocitov; HES = hidroksietilni škrob.

## Neželeni učinki, povezani s postopkom zbiranja NG

Med darovanjem PG lahko nastanejo neželeni učinki, ki so povezani z dajanjem stimulacijskih zdravil ali z granulocitafereznim postopkom. Stimulacija z G-CSF lahko povzroči bolečine v kosteh in mišicah (41 %), glavobol (30 %) in nespečnost (30 %), ki se pojavlja pogosteje ob hkratni stimulaciji s kortikosteroidi.<sup>30–32</sup> Učinki so kratkotrajni, praviloma blage do zmerne stopnje, zato darovalcev navadno ne odvrnejo od ponovnih darovanj. Do danes nimamo na osnovi dvajsetletnih kliničnih izkušenj z zdravilom prav nobenega dokaza, da bi bila uporaba ravnega dejavnika G-CSF pri zdravih darovalcih povezana z večjo obolevnostjo zaradi nekaterih rakavih krvnih bolezni, kot sta akutna mielocitna levkemija (AML) in mielodisplastični sindromi (MDS).<sup>30,31</sup> Nova spoznanja, da G-CSF lahko učinkuje tudi na nemieločne celične linije in ima morda dolgotrajnejše učinkovanje na kromosomsko integriteto limfocitov, še vedno ne odgovarjajo na vprašanje o dolgoročni varnosti uporabe G-CSF.<sup>32</sup> Zato je tudi v prihodnje potrebno natančno sledenje kliničnih podatkov v tej smeri. V skupini darovalcev PG, ki so prejeli kortikosteroide, niso dokazali večje obolevnosti za katarakto, saj je kumulativni odmerek kortikosteroidov relativno majhen.<sup>36</sup>

Neželeni učinki, ki so povezani z granulocitaferezo, so relativno pogosti, vendar blagi in praviloma ne zahtevajo prekinitve odvzema. Ob venepunkciji lahko nastane hematoma, periferna tromboza, poškodba živca ali celo vazovagalna sinkopa. Med samim odvzemom lahko pride do prehodne

hipokalcemije, ki je posledica dodajanja natrijevega citrata (t. i. »citrarna reakcija«). Zaradi sprememb znotrajžilnega volumna se lahko pojavi tudi sinkopa različnih stopenj. HES kot sedimentacijsko sredstvo ima prostorninski učinek na sistemski krvni obtok (glavobol, periferni edemi), povzroči pa lahko tudi alergijske odzive, zmanjša koncentracijo faktorja strjevanja krvi VIII in von Willebrandovega faktorja (vWF), vpliva pa lahko tudi na delovanje ledvic. Učinek na hemostazo in ledvično delovanje je manjši pri nizkomolekularnem HES.<sup>34,35</sup>

## Značilnosti pripravkov nevtrofilnih granulocitov

Po veljavnih priporočilih mora PG vsebovati od  $0,9$  do  $1,2 \times 10^{10}$  NG, volumen pripravka pa mora biti manjši od 500 ml.<sup>4</sup> Predpisano število NG v pripravku zadošča za priporočeni terapevtski odmerek pri bolnikih s telesno maso do 60 kg, ki znaša  $1,5$ – $3,0 \times 10^8$  NG na kg TM prejemnika.<sup>4</sup> Slednje je zaenkrat samo kazalnik uspešnosti zbiranja NG in ne napoveduje terapevtske učinkovitosti odmerka, ki še ni določena. Zbrane NG glede na tip celičnega ločevalca suspendiramo v 200 in 400 ml plazme in vsebujejo primes 10–30 ml eritrocitov (vrednost hematokrita približno 0,1) ter  $1$ – $6 \times 10^{11}$  trombocitov.<sup>4</sup>

Število in kakovost (funkcionalna sposobnost) transfundiranih NG sta ključna dejavnika za učinkovitost zdravljenja, ki pa jo lahko spremljamo le s kliničnimi poskusi, ki so dolgotrajni, zamudni, težko kontrolirani, zahtevajo idealne pogoje in so tudi precej dragi. S kontroliranimi raziskavami do sedaj niso spremljali odvisnost klinične učinko-



vitosti PG od časa njihovega shranjevanja. So pa zato s testiranjem *in vitro* spremljali nekatere lastnosti NG, ki so pomembne za njihovo osnovno delovanje proti različnim okužbam. To so: kroženje NG v krvnem obtoku in telesu (deformabilnost, neadherentnost/odbojnost membrane); sposobnost kemotakse (marginacija, ojačitev adhezije, vezava kemotaksinskega receptorja, reakcija »dražljaj-odziv«, mehanski premik) in uničevanje bakterijskih povzročiteljev okužb (metabolizem energije, sposobnost fagocitoze, tvorba kisikovih radikalov, degranulacija).<sup>37</sup> *In vitro* testi so pomembni predvsem pri optimizaciji postopkov zbiranja in shranjevanja NG, njihovo napovedno vrednost za določanje klinične učinkovitosti transfuzije NG pa bodo pokazale prihodnje raziskave.<sup>38</sup>

### Shranjevanje pripravkov nevtrofilnih granulocitov

NG se kmalu po zbiranju funkcijsko spremenijo in zapadejo v apoptozo. Že po 8–24 urah shranjevanja se njihova migracijska sposobnost na mesto vnetnega dogodka zmanjša za 75%.<sup>39</sup> Med shranjevanjem NG lahko pride do njihove degranulacije in aktiviranja (oksidativni izbruh). Idealni pogoji hranjenja PG bi morali zagotavljati normalno presnovo NG, preprečiti njihovo aktiviranje in vzdrževati njihovo neokrnjeno funkcijsko sposobnost. Na funkcionalno sposobnost NG vpliva vrsta dejavnikov, kot so uporaba G-CSF, sedimentacijskega sredstva, vrednost pH, mešanje med shranjevanjem, razmerje med volumnom pripravka in površino shranjevalne vrečke, gostota celic, shranjevalni medij, število drugih celic v pripravku (eritrocitov, trombocitov, limfocitov), sestava vrečke, vrsta antikoagulantov, temperatura in čas hranjenja. Pogoji hranjenja, ki jih predpisujejo sodobni standardi, temeljijo na izkušnjah iz obdobja pred uporabo ravnega dejavnika G-CSF pri darovalcih, kar ni optimalno.<sup>4</sup> NG, zbrani od takšnih darovalcev, se v funkcijskih testiranjih *in vitro* razlikujejo od NG, zbranih od darovalcev, ki so prejeli le kortikosteroide.<sup>40</sup> Zato je potrebno v procesu shranjevanja upoštevati tudi vpliv ravnega dejavnika G-CSF.

Pomemben učinek na uspešnost shranjevanja imata tudi gostota celic in medij, v katerem so celice shranjene. *In vitro* funkcionalna sposobnost NG, ki jo merimo s testi fagocitoze in oksidativnega izbruha, se je po 24 urah hranjenja zmanjšala za več kot 50 % izhodiščne vrednosti, pri razredčenju pripravka v avtologni plazmi v razmerju 1:4 in 1:8 pa je bila vrednost manjša celo za več kot 90%.<sup>41</sup> Če se za shranjevanje odločimo, NG shranjujemo pri +10°C do 24 ur po odvzemu po rezultatih nekaterih raziskav boljše kot shranjevanje pri +22°C. Kopičenje citokinov (IL-beta, TNF-alfa, IL-6 in IL-8) je manjše pri nižji temperaturi, kar govori v prid manjše degranulacije NG. Neposredno po transfuziji NG, ki so bili shranjeni 24 ur pri +10°C, je bilo v krvnem obtoku le 46 % celokupnega števila NG, ki jih zaznamo v krvi, če NG transfundiramo takoj, tj. brez shranjevanja.<sup>42</sup>

V skladu z veljavnimi priporočili moramo NG transfundirati takoj po postopku zbiranja, shranjevanje pa je omejeno na največ 24 ur pri temperaturi +22°C in brez nenehnega mešanja.<sup>4</sup> V Sloveniji praviloma bolnik dobi pripravek NG v okviru ene ure po zaključenem zbiranju.

Ker so v zbranem pripravku NG tudi viabilni limfociti, pripravek vedno tudi obsevamo z ionizirajočim sevanjem, pri čemer mora biti sevalni odmerek v celotnem pripravku vsaj 25 Gy in ne več kot 50 Gy. S tem preprečimo nastanek bolezni presadka proti gostitelju po transfuziji. Z obsevanjem zmanjšamo tudi verjetnost prenosa nekaterih virusnih okužb (humani herpes virus 6 (HHV 6); virus Epstein Barr (EBV); humani T limfotropni virus 1 (HTLV-1)), na samo kakovost pripravka pa obsevanje ne vpliva.<sup>19,43</sup> Praviloma obsevamo pripravek po shranjevanju oziroma neposredno pred transfuzijo. PG transportiramo pri temperaturi +22°C v ustreznih izoliranih vsebnikih.<sup>4</sup> Med transportom moramo spremljati temperaturo.

## Priporočilo: Shranjevanje in prevoz PG

Zaradi funkcijskih sprememb in manjše klinične učinkovitosti NG po shranjevanju moramo NG shranjevati čim krajši čas po pripravi. Najdaljši dovoljeni čas shranjevanja je 24 ur pri temperaturi +22°C in brez mešanja. Pred transfuzijo pripravke vedno obsevamo z ionizirajočimi žarki. PG prepeljemo pri temperaturi +22°C v ustreznih izoliranih vsebnikih. Med prevozom je potrebno spremljati temperaturo.

## Transfuzija nevtrofilnih granulocitov

Zaradi relativno velikega deleža eritrocitov v pripravku moramo pred transfuzijo NG vedno opraviti navzkrižni preizkus med krvjo prejemnika in darovalca. Zaradi vsebnosti živih limfocitov pripravke NG tudi obsevamo z ionizirajočimi žarki. Pripravek NG transfundiramo skozi standardni transfuzijski 170-mikrometrski filter v 60–120 minutah. Premedikacija z antipiretiki ali s kortikosteroidi pred transfuzijo NG načeloma ni potrebna, je pa včasih smiselna pri prejemnikih z anamnezo povečane telesne temperature, mrzlice ali drugih alergijskih kliničnih stanj po transfuziji krvnih pripravkov. Pred leti je veljalo, da lahko hkrati dajanje transfuzij NG in amfotericina B pri bolniku povzroči nastanek nepojasnjenih pljučnih infiltratov.<sup>48</sup> Čeprav povezava ni bila potrjena, bolniku nikoli ne dajemo obeh pripravkov hkrati, pač pa z nekajurnim presledkom.

Pri zdravljenju s PG lahko pride do različnih neželenih učinkov. Pogost stranski učinek je porast telesne temperature, lahko tudi z mrzlico in s padcem parcialnega tlaka kisika v bolnikovi krvi, kar zahteva ustrezno ukrepanje. V 1–5 % so lahko težave hujše narave in se klinično kažejo kot akutna dihalna odpoved v obliki nekardiogenega pljučnega edema. Na pregledni rentgenski sliki pljuč ob tem ugotavljamo tudi številne pljučne infiltrate, lahko pa pride tudi do padca krvnega tlaka.<sup>47</sup> Takšno stanje zdravimo z dihalno in s hemodinamsko podporo in z velikimi

odmerki kortikosteroidov. V osnovi naj bi bil vzrok nastanek agregatov NG v pljučnem žilju zaradi bolnikovih aloprotiteles. Zaradi neskladnosti v antigenskih sistemih HLA in HNA lahko alloimuniziramo prejemnika na antigene enega sistema ali kar obeh, čeprav je to malo verjetno zaradi praviloma izrazito imunokompromitiranih prejemnikov. Posledica aloimunizacije je neodzivnost na prihodnje transfuzije in nehemolitične vročinske reakcije. Pri transfuziji PG vedno obstaja možnost prenosa bakterijskih in nekaterih virusnih okužb, kot so HIV, HHV 6, HHV 8, EBV, CMV HTLV-1, parvovirus B19, virusi hepatitisa ali celo prionskih bolezni. Vsekakor pa je tveganje zelo majhno v primerjavi s pričakovano koristnostjo zdravljenja.

## Priporočilo: Transfuzija PG

**Pred transfuzijo PG moramo opraviti navzkrižni preizkus. Načela skladnosti AB0 in RhD med prejemnikom in dajalcem PG so enaka kot pri transfuziji eritrocitov. PG transfundiramo skozi standardni transfuzijski 170-mikrometrski filter v 60–120 minutah.**

## Zaključek

Transfuzije PG so način zdravljenja, katerega učinkovitost se je povečala zaradi stimulacije darovalcev z rastnim dejavnikom G-CSF, ki omogoča pripravo večjega odmerka. Tudi v Sloveniji lahko bolnikom zagotovimo PG, ki jih z granulocitaferezo zberemo od usmerjenih, z G-CSF in s kortikosteroidi stimuliranih darovalcev (praviloma sorodnikov ali znancev). V teku so raziskave, kako pripraviti terapevtsko učinkovite PG tudi iz zlitja TLP iz polne krvi naključnih krvodajalcev.

## Literatura

1. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defence. *Ann Intern Med* 1988; 109: 127–42.
2. Dale DC, Liles WC, Price TH. Renewed interest in granulocyte transfusion therapy. *Br J Haematol* 1997; 98: 497–501
3. Pravilnik o zbiranju, pripravi, shranjevanju, razdeljevanju in prevozu krvi in komponent krvi 2007. Ur l RS 9/07
4. Component monographs. Part E, White blood cells. In: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 15th ed. Strasbourg: European Directorate for the quality of Medicines & HealthCare; 2009. p. 261–6.
5. Strauss RG. Neutrophil (granulocyte) transfusions in the new millennium. *Transfusion* 1998; 38: 710–2.
6. Freireich EJ, Levin RH, Whang J, Carbone PP, Bronson W, Morse EE. The function and fate of transfused leukocytes from donors with chronic myelocytic leukemia in leukopenic patients. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 113: 1081–9.
7. Strauss RG. Granulocyte transfusion. In: McLeod BC, Price TH, Drew MJ, ed. *Apheresis: Principles and Practice*. Bethesda: AABB Press; 1997. p. 195–209.
8. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258: 9017–23.
9. Bensinger WI, Price TH, Dale DC, Appelbaum FR, Clift R, Lilleby K, et al. The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leucapheresis. *Blood* 1993; 81: 1883–8.
10. Athens J, Haab O, Raab S, Mauer A, Ashenbrucker H. Leukokinetic studies. IV, The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40: 989–95.
11. Kelton JG, Bebenek G. Granulocytes do not have surface ABO antigens. *Transfusion* 1985; 25: 567–9.
12. McCullough J, Clay M, Loken M, Hurd D. Effect of ABO incompatibility on the fate in vivo of 111indium granulocytes. *Transfusion*, 1998; 38: 358–61.
13. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi 2007. Ur l RS 9/07
14. Winston DJ, Ho WG, Howell CL, Miller MJ, Mickey R, Martin WJ, et al. Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions. *Ann Intern Med* 1980; 93: 671–5.
15. Vij R, DiPersio JF, Venkatraman P, Trinkaus K, Goodnough LT, Brown RA, et al. Donor CMV serostatus has no impact on CMV viremia or disease when prophylactic granulocyte transfusions are given following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 2067–9.
16. Nichols GW, Price T, Boeckh M. Cytomegalovirus infections in cancer patients receiving granulocyte transfusions. *Blood* 2002; 99: 2483–4.
17. Goldstein IM, Eyre HJ, Terasaki PI. Leukocyte transfusions: role of leukocyte alloantibodies in determining transfusion response. *Transfusion* 1971; 11: 19–24.
18. Chatta GS, Price TH, Allen RC, Dale DC. Effects of in vivo recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor on the neutrophil response and peripheral blood colony-forming cells in healthy young and elderly adult volunteers. *Blood* 1994; 84: 2923–9.
19. Liles WC, Huang JE, van Burik JA, Bowden RA, Dale DC. Granulocyte colony-stimulation factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis* 1999; 179: 1012–15.
20. Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. Granulocyte colony-stimulation factor: Role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995; 172: 1061–75.
21. Liles WC. Regulation of apoptosis in neutrophils: Fast track to death? *J Immunol* 1995; 155: 3289–91.
22. Stroncek DF, Matthews CL, Follmann D, Leitman SF. Kinetics of G-CSF-induced granulocyte mobilization in healthy subjects: effects of route of administration and addition of dexamethasone. *Transfusion* 2002; 42: 597–602.
23. Liles WC, Huang JE, Llewellyn C, SenGupta D, Price TH, Dale DC. A comparative trial of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normal volunteers. *Transfusion* 1997; 37: 182–7.
24. Winton EF, Vogler WR. Development of practical oral dexamethasone premedication schedule leading to improved granulocyte yields with the continuous-flow centrifugal blood cell separator. *Blood* 1978; 52: 249–53.
25. Price TH, Bowden RA, Boeckh M, Liles WC, Llewellyn C, Fuller F, et al. Neutrophil collection from community apheresis donors after granulocyte colony-stimulating factor and dexamethasone stimulation: Feasibility and efficacy. *Blood* 1997; 90 Suppl 1: 137B.
26. Reinhardt P, Lux H, Krug E, Schrezenmeier H, Wiesneth M. Enhanced granulocyte yield using 6 % HES of high molecular weight for G-CSF mobilized granulocytapheresis. *Transfus Med Hemother* 2003; 30 Suppl 1: 50.
27. Strauss RG, Hester JP, Vogler WR, Higby DJ, Snikeris AC, Imig KM, et al. A multicenter trial to document the efficacy and safety of a rapidly excreted analog of hydroxyethyl starch for leukapheresis with a note on stimulation of granulocyte donors. *Transfusion* 1986; 26: 258–64.
28. Lee J-H, Leitman SF, Klein HG. A controlled comparison of the efficacy of hetastarch and pentastarch in granulocyte collections by centrifugal leukapheresis. *Blood* 1995; 86: 4662–6.
29. Leitner G, Panzer S, Reesink HW, Stiegler G, Fischer-Nielsen A, Dickmeiss E, et al. Preparation of granulocyte concentrates by apheresis. *Vox sanguinis* 2010; 98: 567–75.
30. Pamphilon D, Mackinnon S, Nacheva E, Russell N, Wilson K, Clay M, et al. The use of granulocyte colony-stimulating factor in volunteer blood and marrow registry donors. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 699–700.
31. Bennett CL, Evens AM, Andritsos LA, Balasubramanian L, Mai M, Fisher MJ, et al. Haematologi-

- cal malignancies developng in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *Br J Haematol* 2006; 135: 642–50.
32. Quillen K, Bryne P, Ying Yau Y, Leitman E. Ten-years follow-up of unrelated volunteer granulocyte donors who have received multiple cycles of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone. *Transfusion* 2009; 49: 513–8.
  33. Anderlini P, Champlin RE. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood* 2008; 111: 1767–72.
  34. Franz A, Bräunlich P, Gamsjäger T, Felfernig M, Gustorff B, Kozek-Langenecker SA. The effects of hydroxyethyl starches of varying molecular weights on platelet function. *Anesth Analg* 2001; 92: 1402–7.
  35. Jungheinrich C, Scharpf R, Wargenau M, Bepplerling F, Baron JF. The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethyl starch 130/0.4 (6 %, 500 ml) in mild-to-severe renal impairment. *Anesth Analg* 2002; 95: 544–51.
  36. Burch JW, Mair DC, Meny GM, Moroff G, Ching SS, Naidoff MA, et al. The risk of posterior Subcapsular cataracts in granulocyte donors. *Transfusion* 2005; 45: 1701–8.
  37. Bashir S, Cardigan R. Granulocyte concentrates: how can we asses their quality? *Transf Med* 2003; 13: 245–57.
  38. Leavey PJ, Thurman G, Ambruso DR. Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF. *Transfusion* 2000; 40: 414–9.
  39. Hubel K, Rodger E, Gaviria JM, Price TH, Dale DC, Liles WC. Effective storage of granulocytes collected by centrifugation leukapheresis from donors stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion* 2005; 45: 1876–89.
  40. Bux J, Cassens U, Dielschneider T, Duchscherer M, Edel E, Eichler H, et al. Tolerance of granulocyte donors toward granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of multicentre study. *Vox Sang* 2003; 85: 322–5.
  41. Schwanke U, Schrader L, Moog R. Storage of neutrophil granulocytes (PMNs) in additive solution or in autologous plasma for 72 h. *Transf Med* 2005; 15: 223–31.
  42. McCullough J, Weiblen BJ, Fine D. Effects of storage of granulocytes on their fate in vivo. *Transfusion* 1983; 23: 20–4.
  43. Button LN, DeWolf WC, Newburger PE, Jacobson MS, Kevy SV. The effect of irradiation on blood components. *Transfusion* 1981; 21: 419–26.
  44. Hubel K, Carter R, Liles W. Granulocyte transfusion therapy for infections in candidates and recipients of hematopoietic stem cell transplant: a comparative analysis of feasibility and outcome of community donors versus related donors. *Transfusion* 2002; 42: 1414–21.
  45. Kerr JP, Liakopolou E, Brown J, Cornish JM, Fleming D, Massey E, et al. The use of stimulated granulocyte transfusions to prevent recurrence of past severe infections after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2003; 123: 114–8.
  46. Oza A, Hallemeier C, Goodnough L, Khoury H, Shenoi S, Devine S, et al. Granulocyte-colony-stimulating factor-mobilised prophylactic granulocyte transfusions given after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation result in a modest reduction of febrile days and intravenous antibiotic usage. *Transfusion* 2006; 46: 14–23.
  47. Bishton M, Chopra R. The role of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2004; 127: 501–8.
  48. Wright DG., Robichaud KJ, Pizzo PA. Lethal pulmonary reactions with the combined use of amphotericin B and leukocyte transfusions. *N Engl J Med* 1981; 304: 1185–9.