

Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Roman Małachowski

**Bezpieczeństwo i wydajność procesu pobierania
krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej
za pomocą separatora komórkowego.**

Praca na stopień doktora nauk medycznych.

*Promotor: prof. dr hab. n. med.
Agnieszka Wierzbowska*

Łódź 2021

1. STRESZCZENIE

Procedura aferezy z wykorzystaniem separatora komórkowego jest szeroko uznaną metodą pobierania krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej do przeszczepów autologicznych i allogenicznych. Ciągły rozwój dziedziny i postęp technologiczny sprawiają, że doskonalili się dostępne rozwiązania oraz wprowadza nowe. Jedną z najnowszych procedur możliwych do wykonania z użyciem separatora Spectra Optia (Terumo BCT) to ciągły pobór komórek jednojądrzastych (ang. *continuous mononuclear cell collection*, cMNC). Ocena bezpieczeństwa podczas prowadzonych procedur jest jednym z kluczowych zagadnień poruszanych przez klinicystów.

Celem pracy była retrospektywna ocena nowej procedury cMNC i porównanie jej z dotychczas dostępną procedurą poboru komórek jednojądrzastych (ang. *mononuclear cell collection*, MNC), a w tym porównaniu parametrów procedury, analiza czynników mających wpływ na wydajność i bezpieczeństwo zabiegu.

Ponadto celem badania było stworzenie w oparciu o dane retrospektywne algorytmu umożliwiającego precyzyjne wyznaczenie objętości krwi do przetworzenia przez separator oraz przewidziany uzysk (ilość komórek CD34⁺/kg m. c.). Powstały algorytm został zbadany prospektywnie na procedurze cMNC.

Najważniejsze obserwacje dotyczące porównania protokołu MNC i cMNC to: większe zagęszczenie elementów morfotycznych oraz mniejsza objętość produktów aferezy prowadzonej protokołem cMNC w porównaniu do MNC (WBC, granulocyty, komórki jednojądrzaste); większa wydajność pobierania CD34⁺ CE2 oparta tylko na wyjściowej liczbie komórek CD34⁺ we krwi pacjenta przed aferezą, dla procedury MNC mediana 58,8% w porównaniu do 51,3% dla cMNC, $p=0,003$. Wykazano silną zależność wyjściowej liczby komórek CD34⁺, a uzyskiem, czyli liczbą komórek CD34⁺ w przeliczeniu na kilogram masy ciała zarówno dla procedur MNC ($r=0,96$), jak i cMNC ($r=0,93$). Wydajność CD34⁺ CE2 dla obu procedur korelowała z wyjściową liczbą WBC i komórek jednojądrzastych, nie korelowała natomiast z wyjściową liczbą komórek CD34⁺ we krwi, objętością przetworzonej krwi, czy prędkością napływu.

Ponieważ bezpieczeństwo pacjenta podczas pobierania komórek ma kluczowe znaczenie, zbadano wpływ aferezy na poziom płytek krwi oraz hemoglobiny pacjenta. Ubytek płytek krwi po aferezie był mniejszy dla nowej procedury cMNC, mediana 12,2%

w porównaniu do 24,2%, $p=0,002$. Zbadano również wpływ czynników mających wpływ na ubytek płytek. Poziom hemoglobiny przed i po zabiegu nie różnił się istotnie statystycznie u pacjentów poddanych separacji komórek procedurą MNC, natomiast spadek ten był istotny statystycznie dla procedury cMNC, $p=0,009$.

W przypadku obu procedur, na danych retrospektywnych zbadano algorytmy predykcyjne: model oparty na średniej wydajności CE2, model regresji oparty na kalkulacji, która nie uwzględnia masy ciała (dopasowanie liniowe i potęgowe), model regresji oparty na kalkulacji, która uwzględnia masę ciała (dopasowanie liniowe i potęgowe). Walidacje algorytmów (wykresy przedstawiające zależność przewidzianego do rzeczywistego uzysku) sporządzone dla procedury MNC dały zbliżone wyniki, tj. wysoki stopień korelacji, współczynnik determinacji R^2 zawierający się w przedziale 0,9474 - 0,9547. Nieco niższe wartości współczynnika determinacji R^2 zanotowano na wykresach walidacji dotyczących procedury cMNC, przedział 0,7871 - 0,8169. Przeprowadzono również analizę ilości niedoszacowanych i przeszacowanych procedur, czyli tych, w których przewidziany uzysk był odpowiednio niższy lub wyższy od rzeczywistego.

Na podstawie powyższej analizy wybrano algorytm oparty na średniej wydajności CD34⁺ CE2 do badania prospektywnego. Odnotowano wysoką korelację uzysku przewidzianego i rzeczywistego, $R^2=0,9028$. Ustalono także skrócenie czasu procedury, mediana 203 min w grupie, w której ilość krwi do przetworzenia była ustalana szacunkowo i 194 min w grupie, w której ilość przetwarzanej krwi wyznaczał algorytm, $p=0,041$. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie ilości antykoagulantu podanego pacjentowi, odpowiednio 894 ml i 676 ml, $p<0,001$.

Zgromadzone w pracy wyniki oraz przeprowadzone analizy pozwoliły na wyciągnięcie poniższych wniosków, mających praktyczny wymiar dla klinicystów i operatorów separatorów komórkowych. Wykazano jednakowy wpływ nowej procedury cMNC na zarządzania antykoagulantem i ilością pobieranych granulocytów. Ustalono, że niezależnie od protokołu i wyjściowej liczby płytek można maksymalizować prędkość napływu, w celu skrócenia czasu procedury, bez obawy o spadek wydajności, czy nadmierny ubytek płytek krwi u pacjenta. W celu zwiększenia bezpieczeństwa zabiegu zaleca się pobierać komórki krwiotwórcze u pacjentów z granicznie niskim poziomem płytek krwi procedurą cMNC, natomiast u pacjentów z granicznie niskim poziomem Hb powinno się wybrać protokół MNC.

Skonkludowano, że algorytmy stworzone z wykorzystaniem regresji liniowej i nieliniowej mogą wykazywać tendencję do przeszacowywania uzysku i jednocześnie przejawiają umiarkowaną korelację w przedziale CD34+pre <100kom./ μ L. Algorytmy te mogą nie doszacować objętości krwi do przetworzenia, co może skutkować koniecznością powtórzenia aferezy lub nawet nieudaną mobilizacją. Zarekomendowano algorytm oparty na średniej wydajności CE2, jako najlepszy do stosowania w praktyce klinicznej, ponieważ wykazał wysoki stopień korelacji oraz brak tendencji do przeszacowania lub niedoszacowania wyników. Zastosowanie tego algorytmu w wyznaczaniu objętości krwi do przetworzenia pozwoliło skrócić czas procedury i ilości podanego pacjentowi antykoagulantu, a jednocześnie zebrać wystarczającą liczbę komórek CD34⁺ do przeprowadzenia przeszczepu.

2. SUMMARY

Apheresis is a widely utilized method for collecting hematopoietic stem cells from peripheral blood for autologous and allogenic stem cell transplantations. Continuous technological development in this field enables improvement of existing solutions as well as developing new ones. One of the latest protocols introduced by Terumo BCT, to be used with Spectra Optia cell separator is continuous mononuclear cell collection (cMNC). Safety assessment of the apheresis procedure is one of the most important issues raised by clinicians.

The aim of this study was to retrospectively evaluate the performance of cMNC protocol and to compare it with widely utilized mononuclear cell collection (MNC) protocol. The analysis included a comparison of safety and efficiency parameters.

Moreover, the study was designed to create and validate algorithms based on retrospective data. The purpose of the algorithm was to calculate blood volume to process and to predict the procedure yield (CD34⁺ cells/kg body weight). The most accurate algorithm was chosen for prospective analysis.

Main observations regarding the procedures comparison include: higher concentration of morphotic components and lower volume of apheresis product in the cMNC procedure compared to MNC (white blood cells, granulocytes, mononuclear cells); higher collection efficiency CD34⁺ CE2 for MNC protocol (median 58,8% for MNC, 51,3% for cMNC, $p=0,003$). A strong correlation between CD34⁺ precount and CD34⁺ yield was observed for both protocols (MNC $r=0,96$; cMNC $r=0,93$). The collection efficiency CD34⁺ CE2 for both protocols was correlated with WBC precount and mononuclear cell precount. Conversely, it did not correlate with CD34⁺ precount, total blood volume (TBV) processed, nor average flow rate.

The platelet count and hemoglobin level in patient's blood was measured before and post apheresis to determine the impact of the protocols on the safety of patients. Platelet loss was lower for the new cMNC protocol, median 12,2% compared to MNC, 24,2% ($p=0,002$). The influence of various variables on platelet loss was also examined. The difference between pre and post hemoglobin level was not statistically significant for MNC protocol. However, in the cMNC protocol post-procedure hemoglobin level was significantly lower ($p=0,009$).

For the predictive analysis five algorithms were created: based on collection efficiency CD34⁺ CE2, regression model including body weight (linear and nonlinear),

regression model not including body weight (linear and nonlinear). Validation graphs, presenting predicted versus collected CD34⁺ yield, resulted in comparable coefficient of determination, R² for the MNC procedure, ranging 0,9474 - 0,9547. Slightly lower coefficient of determination was observed for the cMNC procedure (range 0,7871 - 0,8169). Additionally, the analysis determining the number of underpredicted and overpredicted procedures was performed.

Basing on this retrospective analysis the algorithm based on mean collection efficiency CD34⁺ CE2 was chosen for prospective investigation with the cMNC protocol. High correlation between predicted and collected CD34⁺ dose was noticed, R²=0,9028. The utilization of the algorithm enabled shortening the time of apheresis (median 203 min in the retrospective group, 194 min in the group where the algorithm was employed) and lowering the volume of infused anticoagulant (median 894 ml and 676 ml, p<0,001).

The results collected in this paper and the analyses performed have allowed the following conclusions to be drawn, which have a practical importance for clinicians and cell separator operators. The new cMNC protocol is as safe as the MNC procedure in terms of anticoagulation management and the number of collected granulocytes. Regardless the protocol used and the patient platelet precount, the flow rate can be maximized in order to shorten the time of procedure without the risk of decreased performance or excessive platelet loss in the patient. In order to increase patient safety, it is recommended to perform stem cell collection with the cMNC protocol in patients with low platelet precount and to use MNC protocol for patients with low hemoglobin precount.

The study revealed that regression algorithms, both linear and nonlinear, may show a tendency to overpredict the yield and moderate correlation in the CD34⁺pre 0-100 cells/ μ L range. These algorithms may also underpredict the blood volume to process, which can result in apheresis repetition or even mobilization failure. The study recommends algorithm based on mean collection efficiency CD34⁺ CE2 to be utilized in clinical practice as it has resulted in high coefficient of determination in validation and it does not show a trend to underpredict or overpredict the results. Application of this calculus to determine blood volume to process enabled shortening the time of procedure and lowering the anticoagulant volume, therefore increasing patient safety and reaching CD34⁺ target dose for the transplantation.