

## Souhrnné práce • Původní práce • Kazuistiky

# Odběry dárcovských lymfocytů od nepříbuzných dárců Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) v letech 1999 – 2010

Lysák D.<sup>1</sup>, Hrabětová M.<sup>1</sup>, Jungová A.<sup>1</sup>, Svoboda T.<sup>1</sup>, Navrátilová J.<sup>1,2</sup>, Koza V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň, <sup>2</sup>Český národní registr dárců dřeně

### Souhrn

Analyzovali jsme soubor 45 nepříbuzných dárců, kterým byly v odběrovém centru Českého národního registru dárců dřeně odebrány v průběhu let 1999 – 2010 dárcovské lymfocyty. Při sledování vývoje počtu odběrů v čase byl patrný vzestupný trend v posledních 3 letech. Odběr lymfocytů byl požadován především pro pacienty s akutními leukemiemi, chronickou myeloidní leukemií a ne Hodgkinskými lymfomy (44 %, 18 % a 16 % všech odběrů). Imunoterapie pomocí dárcovských lymfocytů byla nejčastěji indikována pro hematologický či molekulárně genetický relaps (57 % a 16 %) nebo přetrvávající smíšený chimerismus po transplantaci (16 % odběrů). Odběr lymfocytů byl realizován s mediánem 8,4 (1,2–81,8) měsíců po prvním odběru kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk. Odebrané množství odpovídalo 0,9 (0,1 – 5,0) x 10<sup>8</sup> CD3+ buněk na kilogram hmotnosti příjemce. Opakované darování lymfocytů bylo žádáno pouze pro jediného příjemce. Množství získaných CD3+ buněk v aferézním produktu korelovalo s hladinou leukocytů ( $r = 0,427$ ,  $p = 0,0031$ ) a hladinou mononukleárních buněk v periferní krvi dárce před odběrem ( $r = 0,511$ ,  $p = 0,0003$ ). Nežádoucí reakce se v průběhu odběru vyskytly pouze u 9 % dárců a ve všech případech se jednalo o klinicky nezávažné události. Odběr dárcovských lymfocytů představuje bezpečný a minimálně zatěžující způsob darování. Imunoterapie s využitím dárcovských lymfocytů umožňuje řešit řadu komplikací po alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk. V souvislosti s rozvojem nemyeloablativních přípravných režimů, zvýšeným porozuměním potransplantační imunologické interakci atd. lze předpokládat zvyšující se požadavky na darování lymfocytů od původního dárce kmenových buněk i v příštích letech.

**Klíčová slova:** dárcovské lymfocyty, aferéza, nežádoucí reakce, dárce

### Summary

Lysák D., Hrabětová M., Jungová A., Svoboda T., Navrátilová J., Koza V. Donor lymphocyte collections from unrelated donors of the Czech National Marrow Donors Registry (ČNMDR) between 1999 and 2010

We analyzed a group of 45 unrelated donors who had donated donor lymphocytes in the collection centre of the Czech National Marrow Donor Registry between 1999 and 2010. An upward trend was apparent in the past 3 years for the evolution of collection numbers in time. Lymphocyte collection was requested primarily for patients with acute leukaemia, chronic myeloid leukaemia and non-Hodgkin lymphoma (44 %, 18 % and 16 % of all donations). Immunotherapy using donor lymphocytes was most frequently indicated for haematological or molecular relapse (57 % and 16 %) or persisting mixed chimerism after transplantation (16 % of donations). Lymphocyte collection was undertaken at a median of 8.4 (1.3–6) months following the initial collection of bone marrow or peripheral blood stem cells. The collected number corresponded to 0.9 (0.1–5.0) x 10<sup>8</sup> CD3+ cells per kilogram of recipient weight. A repeated lymphocyte donation was requested only for one recipient. The number of CD3+ cells in the product correlated with the leukocyte count ( $r=0,427$ ,  $p=0.0031$ ) and mononuclear cell numbers in donor peripheral blood before donation ( $r=0.511$ ,  $p=0.0003$ ). Adverse events during the donation occurred in only 9 % of donors and in all cases were clinically insignificant. Donor lymphocyte donation is a safe and minimally taxing method of donation. Immunotherapy using donor lymphocytes enables the treatment of many complications following allogeneic haematopoietic stem cells transplantation. With the development of non-myeloablative conditioning regimens and an increased understanding of post-transplant immunological interactions etc., it may be presumed that there will be an increasing demand for lymphocyte donations from the original donors in the years to come.

**Key words:** donor lymphocyte, GVL, adverse reaction, donors

*Transfuzie Hematol. dnes, 17, 2011, No. 4, p. 165–170.*

## Úvod

Infuze dárcovských lymfocytů (DLI) je jednou ze základních metod imunoterapie po alogenní transplantaci

hemopoetických kmenových buněk. Přestože původně byly DLI indikovány především u nemocných s relapsem chronické myeloidní leukemie, v současné době se využívají u celé řady dalších hematologických malignit, jako jsou mnohočetný myelom, akutní leukemie nebo ne-

**Tab. 1.** Charakteristika dárců a aferézních produktů.

počet dárců (n)	45
věk (roky)	33 (22–49)
pohlaví (muži/ženy)	26/19
první darování BM/PBSC	28/17
hmotnost dárců (kg)	82 (50–113)
WBC před odběrem (x 10 <sup>9</sup> /l)	6,65 (4,17–15,49)
mononukleáry před odběrem (x 10 <sup>9</sup> /l)	2,72 (1,25–4,40)
objem aferézy (ml)	11000 (7000–16 500)
žilní přístup (CŽK/PŽK)	6/39
nežádoucí reakce	9 %
požadavek CD3+ (x 10 <sup>8</sup> /kg)	1,0 (0,1–3,0)
odebráno CD3+ (x 10 <sup>8</sup> /kg)	0,9 (0,1–5,0)
požadavek splněn	47 %
doba od prvního odběru do DLI (měs.)	8,4 (1,2–81,8)

mediány; BM – kostní dřev; PBSC – periferní kmenové buňky

hodgkinské lymfomy. S rozvojem nemyeloablativních transplantací se oblasti použití DLI výrazně rozšířily. Vedle léčby potransplantačního relapsu nebo progresu onemocnění jsou aplikovány pacientům s přetrvávajícím smíšeným chimerismem či minimální reziduální nemocí. Pacientům transplantovaným pro vysoce rizikovou malignitu nebo s použitím transplantátu s deplecí T-lymfocytů mohou být DLI podávány dokonce profylakticky (1, 2).

Počet odběrů DLI od zdravých dárců má celosvětově vzestupný trend (3). Podle statistiky EBMT byla v roce 2009 tato forma imunoterapie použita u 16 % pacientů, kteří podstoupili alogenní transplantaci (4). Registry dárců jsou proto častěji žádány transplantacími centry o druhé darování nestimulovaných leukocytů. V porovnání s odběrem periferních kmenových buněk (PBSC) není potřeba dárce mobilizovat pomocí G-CSF a k získání dostatečné dávky lymfocytů zpravidla postačuje také kratší aferéza. Odběr nestimulovaného aferézního produktu tedy představuje pro dárce menší zátěž s nižším rizikem nežádoucích reakcí (5, 6). Po opakovaných odběrech DLI nebo u dárců, kteří jsou odebíráni krátce po darování PBSC, lze někdy pozorovat přechodnou lymfocytopenii (5, 7). Tento potenciální dlouhodobý efekt darování lymfocytů je sledován v rámci dlouhodobé dispenzarizace dárců.

Provedli jsme retrospektivní analýzu druhých darování provedených u dárců Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) v období 1999–2010 se zaměřením na odběry dárcovských lymfocytů. Cílem studie bylo vyhodnotit indikace pro požadavek na darování DLI, vývoj odběrů v čase, kvalitu nestimulovaných aferézních produktů a nežádoucí reakce u dárců v souvislosti s odběrem.

### Soubor dárců

Analýzovali jsme soubor 45 (26 mužů a 19 žen) nepříbuzných dárců hemopoetických krvetvorných buněk, kteří podstoupili v období 1999–2010 druhé darování a byly jim odebrány nestimulované dárcovské lymfocyty. Registr dárců má pro druhé darování stanoven jednotný postup. Indikace k odběru DLI zahrnují relaps základního onemocnění, adoptivní imunoterapii u nemyeloablativních transplantací a léčbu potransplantačních lymfo-

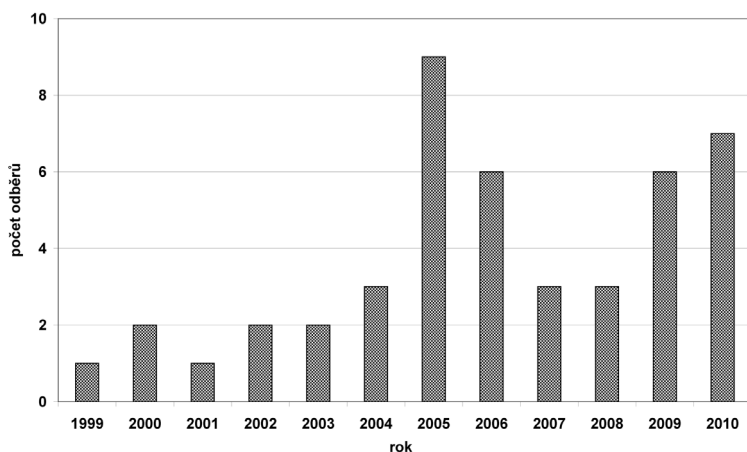
proliferačních. Každá žádost o odběr musí být individuálně posouzena skupinou tří nezávislých expertů, kteří vyhodnotí možný přínos pro daného pacienta a zároveň riziko pro dárce. Na základě jejich doporučení může být teprve dárce uvolněn k odběru. Všichni dárce, kteří vyslovili souhlas s darováním DLI, podstoupili předodběrové laboratorní vyšetření podobně jako před původním odběrem hematopoetických kmenových buněk. Péče o dárce v době odběru a při následné dispenzarizaci se řídila standardy ČNRDD resp. WMDA (World Marrow Donor Association).

Dárcovské lymfocyty byly odebírány metodou aferézy z periferní krve. Zpracovány byly 2 (medián, 1,3–3,3) objemy krve dárce. Jako antikoagulant byl použit roztok ACD-A v poměru 1 : 10–1 : 14 v plné krvi. Odběry byly provedeny na kontinuálních separátorech COBE Spectra (Caridian BCT, Lakewood, CO, USA). Jako prevence citrátové toxicity byla prováděna suplementace kalcia do návratové linky. Většina odběrů byla provedena cestou kontralaterálních předloketních žil. Centrální žilní katétr do femorální žíly bylo nutné zavést pouze u 13 % dárců. Ve standardech registru je doporučena dávka 1,0 x 10<sup>8</sup> CD3+ buněk/kg hmotnosti příjemce jako minimální množství CD3 pozitivních buněk, které by mělo být odebráno, pokud je to technicky možné a pokud není transplantacím centrem požadováno jinak. Zároveň je preferována co nejménší zátěž pro dárce, takže všem dárcům byla provedena pouze jedna aferéza. Základní informace o dárcích jsou sumarizovány v tabulce 1.

Pro statistické vyhodnocení proměnných, které ovlivňují množství odebraných CD3+ buněk, byla využita Spearmanova korelační analýza a výsledky byly graficky vyjádřeny lineární regresí. Vzájemný vztah jednotlivých proměnných byl dále testován multivariátní analýzou. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí software Statistica 98 Edition (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

### Výsledky

V rozmezí let 1999 až 2010 provedl Český národní registr dárců dřeně celkem 45 odběrů dárcovských lymfocytů. Porovnání vývoje žádostí o odběr v čase ukázalo, že odběrů DLI začalo přibývat od roku 2005 a po přechodném poklesu je v posledních třech letech opět jasně patrný vzestupný trend (graf 1). Nejčastějšími diagnózami u pacientů, pro které bylo druhé darování požadováno, byly akutní leukemie (44 %), chronická myeloidní leukemie (18 %) a ne Hodgkinské lymfomy (16 %). Jako nejčastější indikaci k podání DLI uváděla transplantacní centra hematologický (57 %) nebo molekulárně genetický (16 %) relaps malignity nebo perzistující smíšený chimerismus (16 %). Detaily viz graf 2. Požadovaná dávka CD3+ lymfocytů odpovídala 1,0 (medián, 0,1–3,0) x 10<sup>8</sup>/kg hmotnosti příjemce. Odebrat se podařilo množství 0,9 (medián, 0,1–5,0) x 10<sup>8</sup>/kg. Požadovaného množství CD3+ lymfocytů bylo dosaženo u 47 % odběrů. Pouze u jediného dárce byl ze

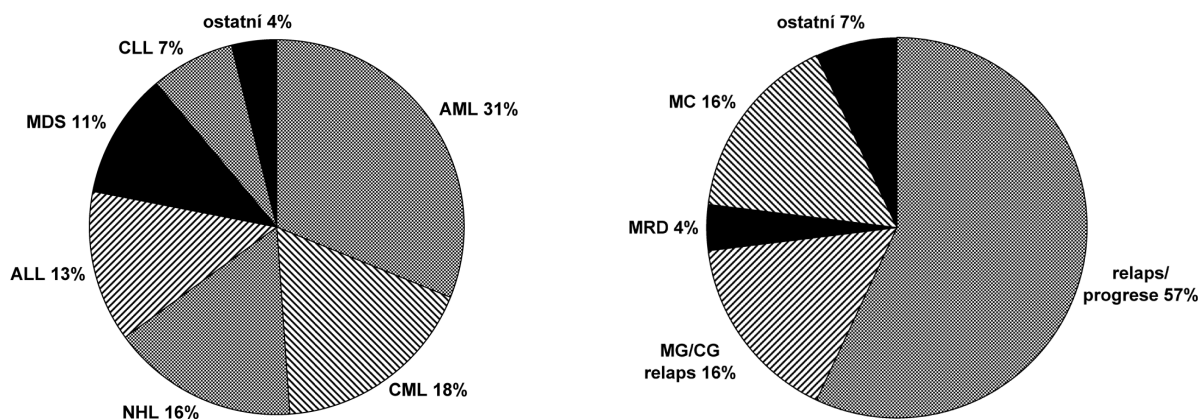


**Graf 1.** Vývoj počtu odběrů DLI v období 1999 – 2010.

Vývoj počtu provedených odběrů dárcovských lymfocytů v období 1999 – 2010. Vzestup odběrů v roce 2005 souvisí se zvýšeným počtem odběrů PBSC provedených v tomto období.

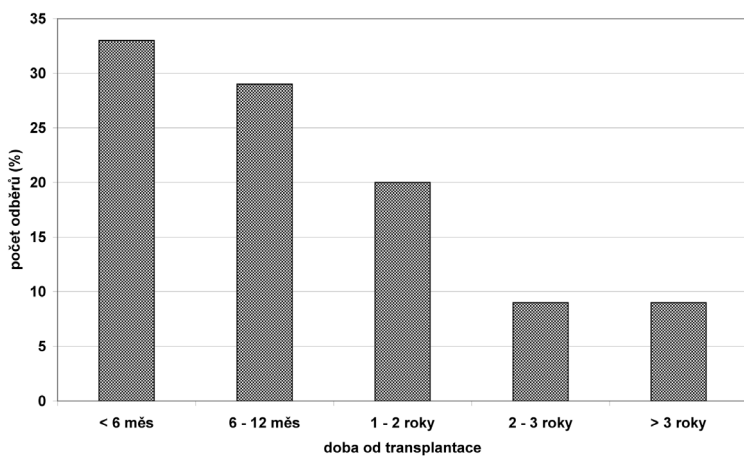
strany transplantačního centra žádán další odběr DLI.

Medián doby mezi původním odběrem kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk a odběrem DLI dosáhl v celém souboru 8,4 měsíce (1,2–81,8). Zhruba třetina odběrů DLI byla však provedena do 6 měsíců a další třetina mezi 6.–12. měsícem od původního odběru hematopoetických kmenových buněk. 70 % resp. 54 % odběrů v těchto časových obdobích se uskutečnilo pro pacienty s akutní leukémií nebo pokročilým myelodysplastickým syndromem. Po více než dvou letech od původního darování byly dárcovské lymfocyty indikovány častěji pro chronická onemocnění typu chronické myeloidní nebo lymfatické leukémie nebo mnohočetný myelom (blíže viz graf 3).



**Graf 2.** Diagnózy a indikace pro podání DLI.

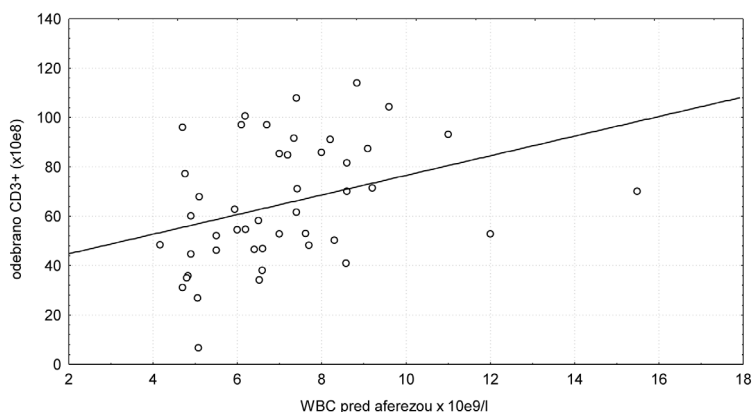
**a.** Diagnózy pacientů, pro něž byly požadovány odběry DLI. Dominují akutní leukémie a MDS (55 % odběrů). **b.** Indikace pro odběr DLI uvedené transplantačními centry v žádostech o druhé darování. Podskupina ostatní zahrnuje: virová encefalitida, selhání štěpu. MC – smíšený chimerismus, MG/CG – cytogenetický/molekulárně genetický relaps, MRD – přetrvávající minimální reziduální nemoc.



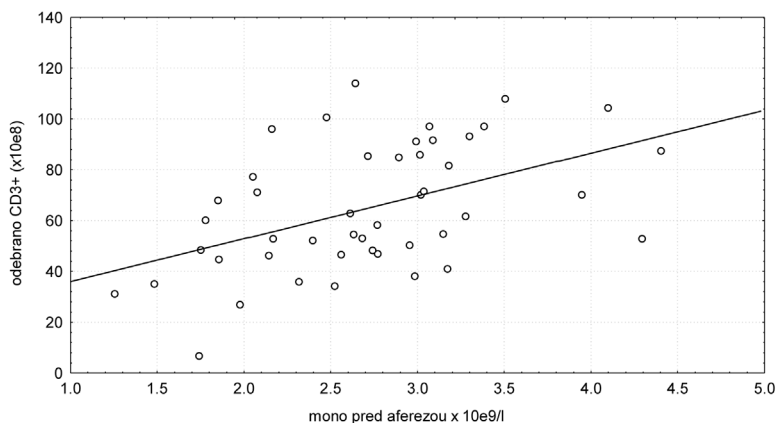
**Graf 3.** Doba od prvního darování do odběru DLI.

Procento odběrů DLI provedených v daných časových obdobích mezi prvním darováním hemopoetických kmenových buněk a druhým darováním DLI; medián 8,4 měsíce (1,2 – 81,8).

Snažili jsme se definovat, jaké proměnné ze strany dárce ovlivňují množství CD3+ buněk odebraných při aferéze, aby případně na jejich základě bylo možné průběh aferézy lépe plánovat s ohledem na požadované množství lymfocytů. Ukázalo se, že množství odebraných T-lymfocytů ( $\times 10^8$ ) koreluje statisticky významně s hladinou leukocytů ( $\times 10^9/l$ ;  $r = 0,427$ ,  $p = 0,0031$ ) a zejména s hladinou mononukleárních buněk (lymfocyty + monocyty) v periferní krvi dárce před odběrem ( $\times 10^9/l$ ;  $r = 0,511$ ,  $p = 0,0003$ ). Tyto dva parametry krevního obrazu také významně korelovaly mezi sebou ( $r = 0,800$ ,  $p < 0,0001$ ). Závislost výtěžku na objemu zpracované krve nebyla potvrzena. Regresní křivky viz graf 4. a 5. Pomocí multivariantní analýzy jsme prokázali, že hladina mononukleárních buněk



**Graf 4.** Závislost množství odebraných CD3+ lymfocytů na hladině WBC před aferézou. Množství CD3+ lymfocytů ( $\times 10^8/\text{kg}$ ) v aferézním produktu koreluje s hladinou leukocytů v periferní krvi dárce před odběrem ( $\times 10^9/\text{l}$ ;  $r = 0,427$ ,  $p = 0,0031$ );  $y = (3,97391)*x + (36,78175)$ .



**Graf 5.** Závislost množství odebraných CD3+ lymfocytů na hladině mononukleárních buněk před aferézou. Množství CD3+ lymfocytů ( $\times 10^8/\text{kg}$ ) v aferézním produktu koreluje s hladinou mononukleárních buněk v periferní krvi dárce před odběrem ( $\times 10^9/\text{l}$ ;  $r = 0,511$ ,  $p = 0,0003$ );  $y = (16,8537)*x + (19,1138)$ .

v periferní krvi před odběrem je nezávislým faktorem určujícím kvalitu nestimulovaného aferézního produktu, tedy množství odebraných T-lymfocytů ( $\beta = 0,51$ ,  $p = 0,0136$ ). Ostatní testované proměnné (hladina leukocytů před odběrem a objem zpracované krve) neměly na tento parametr statisticky významný vliv.

Nežádoucí reakce vzniklé v souvislosti s odběrem byly zaznamenány pouze u 9 % dárců (citrátová toxicita, nauzea, kolapsový stav). Ve všech případech se jednalo o reakce mírné, které nebránily dokončení odběru v plánované délce. Nedošlo k rozvoji žádné závažné nebo neočekávané události u dárce.

## Diskuse

Relaps onemocnění představuje hlavní příčinu úmrtí pacientů po alogenní transplantaci ([www.cibmtr.org](http://www.cibmtr.org)). Jedním z možných léčebných postupů je posílení reakce štěpu proti nádoru, zprostředkované aloreaktivními T-lymfocyty, pomocí redukce imunosupresivní léčby nebo podáním infuze dárce lymfocytů (1). DLI nabízejí

účinný léčebný postup pro část nemocných s relapsem nebo refrakterním onemocněním po alogenní transplantaci. Nejlepšího efektu dosahuje infuze DLI u pacientů s chronickou myeloidní leukémií, kde lze očekávat až 90 % odpovědi. Pravděpodobnost odpovědi na léčbu pak u dalších diagnóz klesá od ne Hodgkinsonských lymfomů přes mnohočetný myelom až po akutní leukémie a pohybuje se do 40–50 %, většinou v kombinaci s cytoredukční chemoterapií (1, 8).

V naší retrospektivní analýze jsme vyhodnotili odběry dárcovských lymfocytů u 45 nepříbuzných dárců, kteří byli odebráni v období 1999–2010. Vzestup počtu odběrů DLI jsme zaznamenali zejména v posledních letech. Tento trend pravděpodobně souvisí s rostoucím počtem nemyeloablativních transplantací, u kterých je potransplantační imunoterapie nezřídka indikována k ovlivnění perzistujícího smíšeného chimerismu nebo minimální reziduální nemoci. Tento vývoj potvrzují i údaje EBMT, které uvádějí za rok 2009 podání dárcovských lymfocytů u cca 40 % pacientů transplantovaných s nemyeloablativním přípravným režimem (4).

Optimální strategie pro aplikaci DLI, její načasování, dávka či kombinace s cytotoxickou terapií není stále sjednocena. Požadavek na odběr DLI se může objevit za různé dlouhou dobu od odběru prvního transplantátu v závislosti na typu malignity, indikaci k DLI atd. (1, 7). V našem souboru byly přibližně dvě třetiny DLI odebrány v prvním roce po prvním darování a to zejména pro pacienty s akutními leukemiemi nebo MDS.

Doporučená dávka CD3+ buněk není taktéž zcela jasná a dávkování se pohybuje v širokém rozmezí  $1 \times 10^6/\text{kg}$  až  $1 \times 10^8/\text{kg}$  jednorázově nebo častěji v režimu eskalujících dávek (1, 8). Jedna aferéza tedy zpravidla postačuje k získání potřebné dávky CD3+ buněk v množství odpovídajícím přibližně  $1 \times 10^8/\text{kg}$  (9). Tuto cílovou dávku se nám podařilo naplnit u 51 % odběrů, požadavek potransplantačního centra byl splněn u 47 % odběrů. Vzhledem k tomu, že darování lymfocytů není spojené s potřebou mobilizace a lze jej opakovat, upřednostnili jsme co největší snížení nepohodlí pro dárce (jedna aferéza, ambulantní výkon, nízká zátěž citrátem) před snahou o maximální výtěžek. Opakovaný odběr DLI byl proveden pouze u jediného dárce, ve všech ostatních případech včetně odběrů s nesplněným požadavkem potransplantačního centra, nebyla další aferéza nutná.

Frekvence nežádoucích reakcí byla při odběru DLI nižší, než je obvyklé při odběrech periferních kmenových buněk. Absence mobilizace filgrastimem, eventuálně i kratší aferéza znamenaly snížení výskytu komplikací na 9 % oproti 20–80 % udávaným při stimulovaných odběrech periferních kmenových buněk (10, 11), respektive 59 %

komplikací, které jsme pozorovali sami u našich dárců PBSC.

Aferézy zejména opakované nebo provedené v relativně krátkém časovém odstupu mohou být spojené s určitou cytoredukcí a přechodným snížením hladiny trombocytů a lymfocytů. Lymfocytopenie může být u některých dárců, v závislosti na době od prvního darování, přítomná už před odběrem DLI jako důsledek předchozího odběru PBSC. V našem souboru jsme nepozorovali před odběrem snížení hladiny mononukleárních buněk pod normální hodnoty, nebyl rozdíl mezi dárci kostní dřeně a PBSC. Ovšem medián doby od prvního odběru byl přibližně 8 měsíců a téměř dvě třetiny dárců podstoupily při prvním darování odběr kostní dřeně, který je spojen s menším rizikem přetrvávající leukocytopenie, takže se diskrétní změny hladiny leukocytů nemusely projevit.

Bezprostředně po odběru DLI dochází k dalšímu poklesu lymfocytů o 10–30 % oproti hodnotám před aferézou (5, 12). Opakované aferézy mohou indukovat určitou lymfocytopenii až u 50 % dárců (7, 13). Rizikovými faktory poklesu hladiny lymfocytů jsou vyšší věk dárce a předchozí odběr PBSC (7). Někteří autoři pozorovali prolongované snížení lymfocytů nebo jejich frakcí po odběru DLI s poklesem o přibližně 20 % při kontrole za 6 měsíců, respektive za dva roky po odběru. Všechny tyto změny však byly statisticky nevýznamné při srovnání se vstupními hodnotami před aferézou (12). Naše retrospektivní analýza bohužel neumožnila hodnocení vývoje hladin lymfocytů po odběru pro neúplnost dat.

Pokles lymfocytů lze tedy vnímat jako jediný potenciální dlouhodobý účinek darování DLI. Tato změna v krevním obraze dárce ovšem nemá žádný klinický dopad, ani nenavozuje u dárce imunodeficitní stav (13). Přesto jsou stanovena pravidla pro frekvenci darování a dispenzariaci dárců po odběru DLI s cílem nepřetěžovat dárce. ČNRDD po odběru DLI dočasně vyřazuje dárce na dobu jednoho roku (pokud interval mezi prvními darováními a DLI je < 6 měsíců) nebo na dobu 6 měsíců (pokud je interval mezi odběry > 6 měsíců). Nicméně každá žádost o druhé darování se posuzuje individuálně a je v kompetenci skupiny nezávislých expertů a vedoucího lékaře registru uvolnit dárce k dalšímu odběru pro stejného příjemce i před uplynutím tohoto období.

Někteří autoři popisují vztah mezi parametry dárce nebo aferézy a množstvím odebraných CD3+ buněk. Objem zpracované krve koreluje s počtem odebraných lymfocytů a umožňuje odhadovat minimální množství zpracované krve nezbytné k získání cílové dávky (5, 6). Jiné práce uvádějí souvislost mezi hladinou leukocytů nebo mononukleárních buněk v periferní krvi před aferézou a množstvím CD3+ lymfocytů v aferézním produktu (14). Podobnou souvislost jsme pozorovali i v našem souboru, kdy hlavním nezávislým prediktorem kvality buněčného koncentrátu byla hladina mononukleárních buněk v periferní krvi. Nezávislý vliv objemu aferézy jsme naopak nepotvrdili. Nicméně tento fakt může být ovlivněn řadou okolností jako dlouhý časový horizont hodnoceného období, během kterého se měnila softwarová verze od-

běrového zařízení, široké rozmezí objemů a doby trvání aferézy, kdy se může různým způsobem uplatnit „recruitment“ lymfocytů během odběru atd.

## Závěr

Odběr lymfocytů od zdravého dárce představuje bezpečný způsob darování, s nízkým rizikem komplikací. Přes vývoj v oblasti biologických léků, který vede k přehodnocení indikace alogenní transplantace u některých hematologických malignit, počet alogenních transplantací neklesá (1). Transplantační postup zůstává jedinou nadějí v případě onemocnění s vysokým rizikem relapsu. Objevují se nové indikace, zvyšuje se počet nemyeloablativních transplantací. Imunoterapie v různé podobě se stává stále důležitější součástí transplantační léčby. Lepší pochopení transplantační imunologie a imunitní rekonstituce po transplantaci by nám v budoucnu mělo umožnit vyvolat reakci štěpu proti nádoru bez zvýšení morbidit a mortality spojené s reakcí štěpu proti hostiteli. Východiskem této imunoterapie jsou a budou lymfocyty nebo jiné hematopoetické buňky dárce.

## Literatura

1. Tomblyn M, Lazarus HM. Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 569-579.
2. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 100: 3108-3114.
3. Bolan CD, Hartzman RJ, Perry EH, et al. Donation activities and product integrity in unrelated donor allogeneic hematopoietic transplantation: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 23-28.
4. Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 485-501.
5. Sato H, Shiobara S, Yasue S, Chuhjo T, Nakao S. Lymphocyte collection for donor leucocyte infusion from normal donors: estimation of the minimum processed blood volume and safety of the procedure. *Vox Sang* 2001; 81: 124-127.
6. Shaz B, Goodarzi K, Malynn E, Uhl L. Improved strategy for mononuclear cell collection for donor lymphocyte infusions. *Transfusion* 2006; 46: 1044-1048.
7. Nicolini FE, Wattel E, Michallet AS, et al. Long-term persistent lymphopenia in hematopoietic stem cell donors after donation for donor lymphocyte infusion. *Exp Hematol* 2004; 32: 1033-1039.
8. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 528-538.
9. Körbling M, Giral S, Khouri I, et al. Donor lymphocyte apheresis for adoptive immunotherapy compared with blood stem cell apheresis. *J Clin Apher* 2001; 16: 82-87.
10. Pulsipher MA, Chiphakdithai P, Miller JP, et al. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2009; 113: 3604-3611.
11. Leitner GC, Baumgartner K, Kalhs P, et al. Regeneration, health status and quality of life after rhG-CSF-stimulated stem cell collection in healthy donors: a cross-sectional study. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 357-363.

12. Strasser EF, Zimmermann R, Weisbach V, Ringwald J, Zingsem J, Eckstein R. Mononuclear cell variability and recruitment in non-cytokine stimulated donors after serial 10-liter leukapheresis procedures. *Transfusion* 2005; 45: 445-452.
13. Kolf CM, Bolan CD, Wesley RA, Browning JN, Feitman SF. Sustained decrease in lymphocyte counts in serial long-term leukapheresis donors. *Transfusion* 2003; 43: S94-040D.
14. Arat M, Önder A, Gürman G, et al. The impact of granulocyte colony stimulating factor at content of donor lymphocytes collected for cellular immunotherapy. *Trans Apher Sci* 2004; 30: 9-15.

*MUDr. Daniel Lysák, PhD*  
*Hematologicko-onkologické oddělení*  
*Fakultní nemocnice Plzeň*  
*Alej Svobody 80*  
*304 60 Plzeň*  
*email: lysak@fnplzen.cz*

*Doručeno do redakce: 12. 7. 2011*

*Přijato po recenzi: 12. 9. 2011*