

ZBIRANJE IN PREDELAVA KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC IZ PLACENTNE KRVI

Dragoslav Domanović

Uvod

Placentna kri iz popkovnice (PKP) je bogat vir krvotvornih matičnih celic (KMC), sposobnih, da se po presaditvi naselijo v kostnem mozgu in pričnejo tvoriti krvne celice (1). PKP vsebuje tudi mezenhimske prednamske celice, ki se lahko v telesu ali na gojiščih razvijejo v celice različnih tkiv, kot so stroma kostnega mozga, hrustanec ter kostno, mišično in vezivno tkivo (2). Novejše raziskave PKP so potrdile prisotnost tudi celic, iz katerih lahko z gojenjem in vitro nastanejo celice endodermalnega izvora - hepatociti (3). Zaradi takšnega potenciala lahko z matičnimi/prednamskimi celicami iz PKP zdravimo številne bolezni. Redkeje se PKP uporablja za avtologne in alogenične transfuzije pri novorojenčkih (4,5).

Po prvi presaditvi KMC iz PKP, ki je bila opravljena leta 1988 pri otroku s Fanconijevo anemijo (6), se njena uporaba nenehno povečuje. Zaradi posebnih bioloških in drugih značilnosti ima PKP v primerjavi s kostnim mozgom večjo in lažjo dostopnost, manjše tveganje za prenos okužbe s citomegalovirusom (CMV) in Epstein-Barrovim virusom ter manjše tveganje za nastanek bolezni presadka proti gostitelju po presaditvi. Glavna pomanjkljivost PK je majhno število KMC, ki večinoma zadostuje za presajanje le pri otrocih in osebah s telesno težo < 40 kg (7). Zato so številne raziskave in naporji usmerjeni v privobivanje čim večjega števila kakovostnih KMC iz PKP. Nekateri zdravijo odrasle bolnike s presajanjem dveh različnih delno skladnih pripravkov alogenične PKP (8), oziroma poskušajo povečati število KMC pridobljenih iz PKP z gojenjem in vitro (9). Po drugi strani se spremljajo in raziskujejo dejavniki, ki vplivajo na število KMC v PKP kot so zbiranje, predelava in shranjevanje PKP.

Presajanje PKP

PKP lahko uporabljamo za zdravljenje bolezni z alogenično (sorodno ali nesorodno) in avtologno presaditvijo. V primeru sorodne alogenične presaditve odvezamo PKP porodnici, katere prejšnji otrok je bolan in je namenjena njegovemu zdravljenju. PKP, ki jo porodnice darujejo in se shranjuje v »javnih bankah«, je namenjena za nesorodne alogenične presaditve. Shranjevanje avtologne PKP se izvaja v »zasebnih bankah« PKP za zagotavljanje rezervnih KMC za zdravljenje s presajanjem v primeru nastanka bolezni v prihodnosti.

Zagotavljanje PKP za presajanje je sestavljeno iz več postopkov. Pred zbiranjem je potrebno potencialni darovalki PKP posredovati vse potrebne informacije, povezane s celotnim postopkom od odvzema do shranjevanja in presaditve PKP. Z anamnezo in pregledom darovalke si potem pridobimo informacije o preteklih boleznih in sedanjem zdravstvenem stanju. Nato nosečnica podpiše pisni pristanek za darovanje PKP in izjavo o poučenosti. Kri darovalke PKP se obvezno laboratorijsko testira na prisotnost označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo (HbsAg, anti- HCV, anti - HIV I/II, anti- HTLV I/II, anti-lues). Testiranje na prisotnost nukleinskih kislin virusov hepatitisa C (HCV) in aidsa (HIV I/II) z verižno polimerazno reakcijo (PCR) je obvezno le v nekaterih

državah. Dodatno se darovalke PKP testirajo na prisotnost okužbe s citomagalovirusom (anti - CMV) in toksoplazmozo (anti -Toxo)

Namen izjavanja teh postopkov je zagotavljanje varnosti potencialnega prejemnika PKP, varnosti ploda in matere/darovalke.

Zbiranje PKP

PKP zbiramo po porodu iz popkovnične vene. Porodničar, ki vodi porod, se med oziroma po porodu dokočno odloči, ali je odvzem PKP primeren ali ne. Spremenljivke, ki veljajo kot relevantni kazalci kakovosti PKP z oziroma na uspešnost preživetja presadka in bolnika, so: volumen, število celic z jedrom in število CD34+ celic (10,11). Številni dejavniki lahko vplivajo na količino PKP in število celic v njej in s tem tudi na izid zbiranja PKP. Na osnovi njihove prisotnosti lahko napovemo uspešnosti zbiranja PKP. Med maternalne dejavnike sodijo kajenje in preeklampsija, ki sta povezana z manjšim volumnom PKP in manjšim številom celic v njej, ter večkratna nosečnost, ko se število celic z jedrom v PKP s slehernim porodom zmanjšuje (12–14). Neonatalna dejavnika, ki vplivata na večji volumen PKP in število celic, sta večja gestacijska starost in večja porodna teža novorojenčka (12,13). Večji volumen PKP zberemo tudi, če je popkavnica daljša in posteljica težja (12–14).

Porodni dejavniki tudi vplivajo na volumen PKP in število celic. Pri porodih s carskim rezom so zbrali večji volumen PKP z manjšim številom levkocitov kot pri vaginalnem porodu. Razlik v številu CD34+ celic pa ni bilo (15). Podaljševanje časa, ki preteče od prekinitve popkovničnega obtoka do začetka zbiranja, ima za posledico zmanjšanje števila celic v PKP (16). Dalj časa trajajoče porode spremlja večje število celic v PKP (17), vendar pa obporodni stres vpliva na zmanjšanje števila celic v PKP (18). Poročali so tudi, da je bil volumen PKP večji, če so postavili otroka na trebuh matere po porodu (19).

Odvzem PKP se izvaja po porodu otroka, ko se popkavnica preveže in preneha utripati (> 40 sekund po porodu). Nekateri zbirajo PKP, ko je placenta ex utero - po njenem porodu (20) drugi, ko je placenta in utero (21), tretji pa uporabljajo kombinacijo obeh načinov (22). Večina raziskav je pokazala, da je volumen zbrane krvi večji in vsebuje večje število monojedrnih celic pri zbiranju PKP iz placente in utero (23) (Tabela 1). Možnost okužbe PKP pa je pri tem načinu večja. Zbiranje PKP, ko je placenta in utero izvaja osebe v porodni sobi, medtem ko zbiranje ex utero lahko izvaja tudi osebe iz banke placentalne krvi v drugem prostoru porodnišnice ali v sami banki PKP. Enotnega standarda ali stališča o načinu odvzema PKP glede na pozicijo placente še ni.

Tabela 1: Primerjava izsledkov zbiranja PKP med postopkom, ko je placenta ex utero in ko je in utero.

	Volumen (ml)		TNC (x10 ⁹)		CD34+ (x10 ⁵)	
	ex utero	in utero	ex utero	in utero	ex utero	in utero
Surbek et al. 1998 (11)	48.42 ± 4.07	83.26 ± 7.9	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
Pafumi et al.2002 (19)	60.9 ± 13.7	90.7 ± 6.0	7.1 ± 0.8	10.1 ± 1.2	1.64 ± 2.4	2.0 ± 0.6
Sparrow et al. 2002 (15)	62	67	10	12.1	2.9	3.8
Solves et al. 2003 (38)	98 ± 28.47	108.82 ± 28.6	8.55 ± 3.52	10.54 ± 4.15	2.96 ± 2.25	3.65 ± 3.38

n.p. – ni podatka

Pred odvzemom je potrebno temeljito dezinficirati popkovnico. Za ta namen večinoma uporabljajo alkoholno raztopino povodon-jodida. Poznamo t.i. »odprti« in »zaprti« odzema PKP. Pri »odprtem« načinu odvzema, ki sodi v zgodovino, se PKP zbira neposredno iz prerezanih popkovničnih žil v sterilno plastično posodico (24). Pri tem je možnost okužbe PKP izredno velika. Zato so kmalu pričeli z »zaprtim« načinom odvzema, ki predvideva punkcijo popkovničnih žil in zbiranje PKP v posebej prirejene plastične vrečke, pri čemer ostane popkovnica prevezana (25).

V dvofaznem načinu se najprej odvzeme PKP v plastično vrečko, ko je placenta in utero. Po porodu placente se popkovnica izmolze v smeri proti placenti in kri aspirira z iglo in brizgo iz placentnega ožilja (26). S tem načinom zberemo večjo količino PKP. Največ PKP zberemo, če infundiramo v umbilikalno arterijo 10 % raztopino ACD v fiziološki raztopini in potem iz popkovnične vene aspiriramo kri preko katetra v brizgo, ki vsebuje 6 ml raztopine ACD (27).

Prenos PKP

Zbrano PKP je potrebno prenesti iz porodnišnice v banko placentne krvi za predelavo in shranjevanje. Ob prenosu se PKP začasno shranjuje do 24 ur na temperaturi +4°C. Ni še raziskano, ali na preživetje celic pri transportu vpliva vrsta plastike vrečk za shranjevanje in ali je potrebno PKP nenehno mešati. Ugotovili so, da je boljše preživetje celic v posebnih raztopinah, kot so Normosol, Plasmalyte A in STM-sav.

Predelava PKP

PKP lahko zmrzujemo in shranjujemo v tekočem dušiku ali pa jo pred zamrzovanjem predelamo. Poznamo več načinov predelave PKP, katere cilji so zmanjšanje volumna z izločanjem eritrocitov in plazme ob minimalni izgubi KMC. S tem se povečajo zmogljivosti skladiščenja PKP, zmanjša se količina uporabljenega in infundiranega toksičnega krioprotektorja dimetilsulfoksida (DMSO) in zmanjša se količina infundiranega prostega hemoglobina iz liziranih eritrocitov. Odstranjevanje eritrocitov je potrebno tudi v primerih AB0 neskladja med prejemnikom in alogenično PKP. Raziskave so potrdile, da je predelava PKP pred shranjevanjem učinkovit postopek, ter da je presaditev predelane PKP klinično uspešna (28,29).

Predelava je lahko ročna, polavtomatska in avtomatska v odprtem ali zaprtim sistemu. Eritrocite in plazmo lahko izločimo iz PKP tako, da ločimo trombocitno levkocitno plast (buffy coat) z diferencialnim centrifugiranjem, kar je povezano z izgubo več kot 30% levkocitov in matičnih/prednamskih celic (30). Izgubo celic so zmanjšali z dvojnimi centrifugiranjem, ko so najprej iz PKP odstanili eritrocite in po drugem centrifugiranju plazmo (31) ali pa so ločevanje izvedli s polavtomatskimi napravami (32). Boljšo predelavo so dosegli z dodajanjem snovi v PKP, ki izboljša ločevanje med eritrociti in celicami z jedrom. Dodajanje 3-odstotne gelatine v PKP je izboljšalo sedimentacijo eritrocitov, vendar se ni uveljavilo v praksi zaradi odprtega načina v epruveti z veliko možnostjo bakterijske in gljivične okužbe in reagenta živalskega izvora (33). Ustvarjanje gradienta gostote s Ficollom (22), Percollom in poligelinom (34) so tudi odprti načini v epruveti, ki se niso uveljavili v praksi. Po dodajanju hidroksietilnega škroba (HES) v PKP eritrociti agregirajo v t. i. »rouleaux« tvorbe in se po centrifugiranju lažje ločujejo s polavtomatskimi napravami (20,35). PKP se lahko filtrira skozi poliuretanski filter, v katerem se zadržijo levkociti, ki se izpirerjo iz filtra z raztopino albumina v fiziološki raztopini (36). Za avtomatski način

predelave PKP se uporabljajo posebne naprave, ki delujejo kot majhni celični ločevalci in v zaprtem mikroprocesorsko vodenem sistemu izločijo eritrocite in plazmo iz PKP(37). V praksi se je uveljavil polavtomatski način z dodajanjem raztopine HES. Primerjava izsledkov nekaterih postopkov predelave PKP je prikazana v *tabeli 2*.

Tabela 2: Izsledki zmanjšanja volumna in preživetja celic pri različnih načinih predelave PKP.

	Avtomatsko (HES) Zingsem et al. (37)	Filtracija Rebulla et al.(36)	Polavtomatsko (HES) Bertolini et al. (35)	Ročno (brez HES)	
				Armitage et al. (32)	Sousa et al (31)
Volumen (ml)	32.6 ± 7.6	21.5	n.p.	24.5 ± 1.5	45 (19–63)
Zmanjšanje volumna (%)	65.1 ± 15.8	n.p.	n.p.	67	56
Preživetje levkocitov (%)	78.6 ± 24.9	49 ± 17	85.8 ± 7.9	83.3 ± 16.8	72 (52–90)
Preživetje CD34+ celic (%)	83.6 ± 32.5	85.3 ± 8.5	83.4 ± 5.6	98.9 ± 15.6	87 (63–99)

n.p. – ni podatka

V nadaljevanju predelave PKP se lahko osamijo CD34+ celic večinoma z imunomagnetnim postopkom oziroma se KMC iz PKP gojijo in vitro na gojiščih.

Po odvzemu in predelavi PKP je potrebno opraviti laboratorijske teste, ki zagotavljajo varnost in kakovost odvzete PKP. Med teste varnosti sodijo serološki testi (HbsAg; anti HCV, anti-HIV I/II, anti HTLV I/II) in testi NAT za določanje označevalcev virusov kot tudi aerobne in anaerobne bakteriološke kulture. Določamo še krvno skupino AB0 in RhD, hemogram, celice CD34⁺, antigene HLA ter CFU-GM. Nekateri priporočajo določanje kontaminacije PKP s celicami iz krvi matere.

Zaključek

Način zbiranja in predelave sta dejavnika, ki lahko vplivata na volumen zbrane PKP in število KMC v njej ter posredno na uspešnost presaditve. V literaturi nismo zasledili standardov ali priporočil, ki bi narekovali, kateri načini zbiranja in predelave PKP so ustrezni za uporabo v praksi. Zato se glede na ostale dejavnike, ki lahko vplivajo na kakovost in varnost zbiranja ter predelave PKP, odločimo za način, ki bo zagotovil zbiranje maksimalnega števila KMC ob čim manjših izgubah celic pri predelavi.

LITERATURA

1. Broxmeyer H, Douglas G, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828–32.
2. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235–42.
3. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem cells* 2003; 21: 217–27.
4. Domanović D, Završnik T, Vesel S. Autologous placental blood transfusion after a planned neonatal pacemaker implantation. *Transfus Med* 2001; 11(6): 459–61.
5. Tanayo JG. The use of residual placental blood for transfusion. *Journal of the Philipp Medical Association* 1966; 42: 399–406.
6. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from HLA identical sibling. *New Engl J Med* 1989; 321: 1174–8.
7. Wadlow RC, Porter DL. Umbilical cord blood transplantation: Where do we stand? *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2002; 8: 637–47.
8. Barker JN, Weisdorf DJ, Wagner JE. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors (letter). *N Engl J Med* 2001; 344: 1870–1.
9. Gan OI, Murdoch B, Larochelle A et al. Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stroma cells. *Blood* 1997; 90: 641–50.
10. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al. Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; 344: 1565–77.
11. Locatelli F, Rocha V, Chastang C et al. Factor associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord Cord Blood Transplant Group. *Blood* 1999; 93: 3662–71.
12. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y et al. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44: 262–7.
13. Ballen KK, Wilson M, Wu J et al. Bigger is better: Maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 7–14.
14. Surbek DV, Danzer E, Steinmann C et al. Effect of preeclampsia on umbilical cord blood hematopoietic progenitor-stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(3): 725–9.
15. Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT et al. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion* 2002; 42: 210–5.
16. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P et al. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(2): 503–9.
17. Aufderhaar U, Holzgreve W, Danzer E et al. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. *J Perinat Med* 2003; 31(4): 317–22.
18. Donaldson C, Armitage WJ, Laundry V et al. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *Br J Haematol* 1999; 106: 128–32.
19. Pafumi C, Zizza G, Farina M et al. Placing the newborn on the maternal abdomen increases the volume of umbilical cord blood collected. *Clin Lab Haematol* 2001; 23(6): 397–9.
20. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119–22.
21. Bertolini F, Lazzari L, Lauri L et al. A comparative study of different procedures for collection and banking of umbilical cord blood. *J Hematother* 1995; 4: 29–36.
22. Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 135–43.
23. Surbek DV, Schönfeld B, Tichelli A et al. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placental delivery. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 311–2.
24. Wong A, Yuen PMP, Li K et al. Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic cells, leukocyte subpopulations and macroscopic clots. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 133–8.
25. Wagner JE, Broxmeyer HE, Cooper S. Umbilical cord and placental blood hematopoietic stem cells: Collection, cryopreservation and storage. *J Hematother* 1992; 1: 167–73.
26. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1990; 17: 313–29.
27. Turner CW, Luzins J, Hutcheson C. A modified harvest technique for cord blood haematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 89–91.
28. Falkenburg JHF, van Luxemburg-Heijs SAP, Zijmans JM et al. Separation, enrichment and characterization of human hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood. *Ann Hematol* 1993; 67: 231–6.

29. Pahwa RN, Fleischer A, Than S, Good RA. Successful hematopoietic reconstitution with transplantation of erythrocyte-depleted allogeneic human umbilical cord blood cells in child with leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4485–8.
30. Ullman J, Perry E, Fautsch S, McCoullough J. Red blood cell depletion of umbilical cord blood for transplantation. *Blood* 1993; 82 (Suppl. 1) : 393a (Abstr. 1557).
31. Sousa T, de Sousa ME, Godinho MI et al. Umbilical cord blood processing: volume reduction and recovery of CD34+ cells. *Bone Marrow transplant* 1997; 19: 311–3.
32. Armitage S, Fehily D, Dickinson A et al. Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 505–9.
33. Nagler A, Peacock M, Tantoco M et al. Separation of haematopoietic progenitor cells from human umbilical cord. *J Hematother* 1993; 2: 243–5.
34. Almici C, Carlo-Stella C, Mangoni L et al. Density separation of umbilical cord blood and recovery of hematopoietic progenitor cells: implication for cord blood banking. *Stem cells* 1995; 13: 533–40.
35. Bertolini F, Battaglia M, Zibera C et al. A new method for placental/cord blood processing in the collection bag. I. Analysis of factors involved in red blood cell removal. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 783–6.
36. Rebullà P, De Bernardi N, Villa A et al. Evaluation of a new device for volume reduction of placental blood units by filtration through polyurethane. *Vox Sang* 1998; 74 (Suppl. 1; abstr): 36.
37. Zingsem J, Strasser E, Weisbach V et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* 2003; 43: 806–13.
38. Solves P, Moraga R, Saucedo E et al. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 269–73.