

Kakovost odmrznjenih pripravkov krvotvornih matičnih celic za presaditev

Quality of thawed hematopoietic progenitor cell grafts

Metka Krašna, Elvira Maličev, Mojca Jež, Andreja Nunar Perko, Marko Cukjati

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Metka Krašna,
e: metka.krasna@ztm.si

Ključne besede:

živost; CD34+; transplantacija; krvotvorne matične celice; zamrzovanje

Key words:

viability; CD34+; transplantation; hematopoietic progenitor cells; cryopreservation

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2015;
84: 432–8

Prispelo: 30. sept. 2014,
Sprejeto: 2. dec. 2014

Izvleček

Izhodišča: Ustrezen odmerek skladnih in živih krvotvornih matičnih celic je ključen, da se presadek KMC po presaditvi obdrži pri bolniku. V raziskavi smo zato preverili živost KMC v odmrznjenih pripravkih KMC, ki smo jih presadili hematološkim bolnikom v enem letu.

Metode: KMC smo pridobili z aferezo in jih zamrznili v programiranem zamrzovalniku v avtologni plazmi z 10 % DMSO-jem ter jih shranili v pari tekočega dušika. Vrečke s KMC smo odmrznili v vodni kopeli ob bolnikovi postelji. V ostankih izpirkov vrečk po dodatku fiziološke raztopine smo s pretočnim citometrom določili živost (7-AAD) pri KMC (celice CD34+) in levkocitih.

Rezultati: V ostankih celičnih suspenzij (n = 88) po presaditvi KMC je bila živost KMC $79,9 \pm 12,4\%$, živost levkocitov pa $62,2 \pm 12,2\%$ (parni t-test, $P < 0,001$). Povprečna živost KMC v vzorcih, ki so bili zamrznjeni takoj po odvzemu (n = 58), je bila $79,9 \pm 9,2\%$, pri vzorcih, zamrznjenih naslednji dan po 18 urah v hladilniku, pa je bila $80,5 \pm 11,3\%$ (n = 67). Shranjevanje vzorcev čez noč ni značilno vplivalo na živost celic v primerjavi s takoj zamrznjenimi vzorci (t-test, $P > 0,5$). Spiranje vrečk KMC in shranjevanje celic po odmrzovanju v fiziološki raztopini je značilno (n = 7; parni t-test, $P < 0,01$) povečalo smrtnost KMC, saj je bila živost takoj po odmrznitvi $84,1 \pm 4,5\%$, pri vzorcih, redčenih s fiziološko raztopino, pa $60,1 \pm 15,7\%$.

Zaključki: V našem laboratoriju pri zamrzovanju in odmrzovanju pripravkov KMC propade v povprečju 20 % KMC. Zamrzovanje pripravkov KMC po 18 urah od odvzema celic ne vpliva na živost odmrznjenih celic v primerjavi s takoj zamrznjenimi pripravki. Fiziološka raztopina ni primerna za spiranje vrečk in shranjevanje ostanka KMC po odmrznitvi pripravkov KMC.

Abstract

Background: The appropriate dose of compatible and viable hematopoietic progenitor cells is crucial for successful engraftment of transplanted cells within patients. In the study we therefore checked the viability of HPC in thawed HPC grafts that were transplanted into haematology patients in one year.

Methods: We acquired HPC by apheresis and froze them in a programmable freezer in autologous plasma with 10 % DMSO and stored them in liquid nitrogen vapour. We thawed the bags with HPC in a water bath at the patient's bedside and in the eluate residues from the bags after the addition of saline solution we determined the viability (7-AAD) of HPC (CD34+) and lymphocytes by flow cytometry.

Results: After the transplantation of HPC, the viability of HPC was $79.9 \pm 12.4\%$, and of leukocytes $62.2 \pm 12.2\%$ (paired t-test, $P < 0.001$) in cell suspension residues (n = 88). The average viability of HPC in samples that were frozen immediately after collection (n = 58) was $79.9 \pm 9.2\%$, and in samples frozen the next day after 18

hours in the fridge, the viability was $80.5 \pm 11.3\%$ ($n = 67$). Storing samples overnight did not significantly affect the viability of cells in comparison with samples that were frozen immediately (t-test, $P > 0.5$). Rinsing of HPC bags and storing cells after thawing in saline solution significantly ($n = 7$; paired t-test, $P < 0.01$) increased the mortality of HPC, since the viability immediately after thawing was $84.1 \pm 4.5\%$, whereas in samples diluted with saline solution it was $60.1 \pm 15.7\%$.

Conclusions: In our laboratory, cca 20 % of HPC are lost during freezing and thawing of HPC grafts. Freezing HPC grafts 18 hours after cell collection does not affect the viability of thawed cells in comparison with grafts that are frozen immediately. Saline solution is not suitable for rinsing bags and storing HPC residuals after thawing HPC products.

Uvod

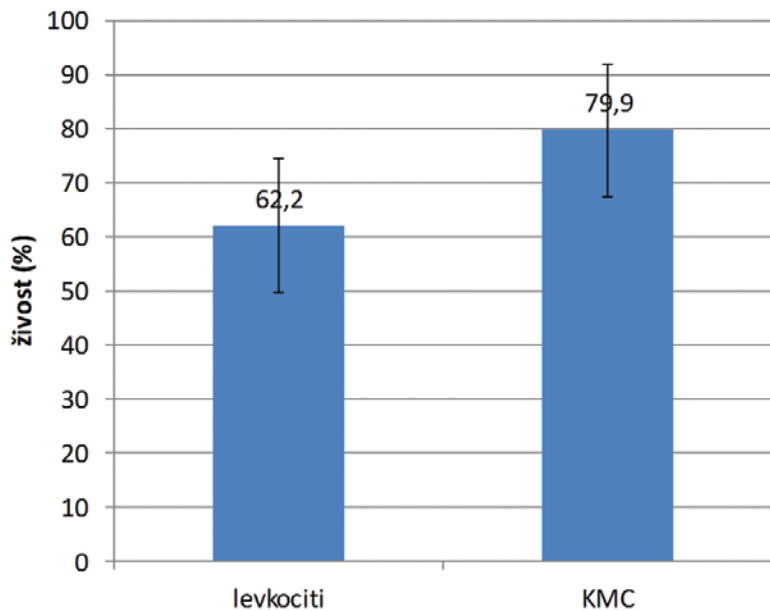
Iz krvotvornih matičnih celic se razvijajo vse celične vrste, ki so prisotne v krvi. S postopno diferenciacijo prek različnih stopenj predniških celic nastanejo celice limfatične vrste (limfociti T, limfociti B in celice naravne ubijalke) ter celice mieločne vrste (monociti, makrofagi, nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci, eritrociti in trombociti). So v kostnem mozgu, od koder se izplavljajo v periferno kri, prav tako pa so tudi v popkovnični krvi. V kostnem mozgu pri zdravih ljudeh predstavljajo v povprečju 1,5 % populacije enojedrnih celic, ¹ v popkovnični krvi do 1 %, ^{2,3} v periferni krvi pa jih je manj kot 0,1 %.⁴ Pri tretiranju bolnika z rastnimi dejavniki, kot je dejavnik, ki spodbuja razvoj granulocitov (G-CSF), ali z učinkovino ciklofosamid, lahko odstotek KMC v periferni krvi na račun mobilizacije celic iz kostnega mozga naraste na 0,5 %.^{5,6}

Presaditev KMC je še vedno najbolj razširjena oblika celičnega zdravljenja, saj letno opravijo na svetu več kot 50.000 presaditev.⁷ V Sloveniji smo jih leta 2013 opravili 112.⁸ Presaditev KMC je primerna za zdravljenje malignih in nekaterih nemalignih bolezni kostnega mozga in drugih krvotvornih organov (levkemije, mielodisplastični sindromi, diseminirani plazmocitom, maligni limfomi, huda oblika aplastične anemije) ter nekaterih drugih bolezni (nekatero solidne novotvorbe, podedovane bolezni in avtoimunske bolezni).⁹⁻¹¹ Na uspešnost presaditve KMC vpliva bolnikovo stanje, število presajenih KMC in kakovost pripravka KMC. Za uspešno presaditev KMC iz periferni krvi velja, da mora prejemnik dobiti vsaj 2×10^6 živih celic KMC na kg telesne teže pri avtologni presaditvi in vsaj 5×10^6 živih celic KMC na

kg telesne teže pri alogenski presaditvi.¹² Ustrezno število KMC za presaditev pridobimo po stimuliranju bolnikov s krvotvornimi rastnimi dejavniki. Najpogosteje jih zberemo z aferezo iz venske krvi, redkeje pa z aspiracijo kostnega mozga. Za celične pripravke velja, da so za presaditev uporabni največ 72 ur po odvzemu celic, saj s časom, ki ga celice preživijo zunaj telesa, izgubljajo vitalnost in propadajo. KMC iz kostnega mozga in periferni krvi lahko shranjujemo do 3 dni pri temperaturi od 2 do 10 °C, oziroma za kostni mozeg velja do 24 ur, in periferni KMC do 12 ur pri temperaturi od 2 do 24 °C.¹³ Višek celic, ki se ne uporabi za presaditev, lahko zamrznemo in po potrebi, ko bolnik spet potrebuje presaditev KMC, celični pripravek odmrzujemo. Zamrzovanje in odmrzovanje poškoduje del celic, zato je pomembno, da za zamrzovanje, shranjevanje in odmrzovanje celic uporabimo postopke, ki so za celice najmanj škodljivi. Obenem moramo pri načrtovanju presaditve KMC upoštevati, da se po odmrznitvi pripravka zmanjša število živih celic, kar lahko vpliva na hematopoezo po presaditvi.

Metode

Namen naše raziskave je bil določiti delež živih oziroma mrtvih celic v odmrznjenih celičnih pripravkih za presaditev, ki jih pripravljamo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Raziskava je potekala tako, da smo iz ostankov razredčene celične suspenzije po presaditvi KMC odvzeli vzorec in s pretočno citometrijo izmerili delež neživih celic v populaciji vseh levkocitov in v populaciji KMC. Levkocite smo označili s protite-



Slika 1: Živost celic po odmrzovanju pripravkov KMC. V ostankih celičnih suspenzij po presaditvi KMC smo izmerili živost celic z barvilom 7-AAD. Podatki pomenijo povprečje \pm SD na 88 vzorcih. Živost KMC je bila $79,9 \pm 12,4$ %, živost levkocitov pa $62,2 \pm 12,2$ %. Povprečna živost KMC je bila za 18 % večja od živosti levkocitov in se je statistično značilno razlikovala (t-test, $P < 0,001$).

lesi proti molekuli CD45, KMC pa s protitelesi proti glikoproteinu CD34. Preverili smo tudi, ali shranjevanje pripravka KMC v hladilniku za 18 ur pred zamrzovanjem vpliva na živost celic po odmrzovanju. Meritve smo opravljali 1 leto pri vseh celičnih pripravkih, ki smo jih odmrznili in presadili bolnikom na Kliničnem oddelku za hematologijo ali Kliničnem oddelku za otroško hematologijo in onkologijo v Ljubljani. Pripravki so bili zamrznjeni od 1 meseca do 6 let. Ker je po opravljeni presaditvi prenos razredčenih vzorcev potekal iz klinike v laboratorij od 30 do 90 minut, smo preverili tudi vpliv načina vzorčenja na samo meritev živosti celic. Za to smo v laboratoriju odmrznili 7 naključnih pripravkov preminulih bolnikov in jih analizirali.

Zbiranje in zamrzovanje celic

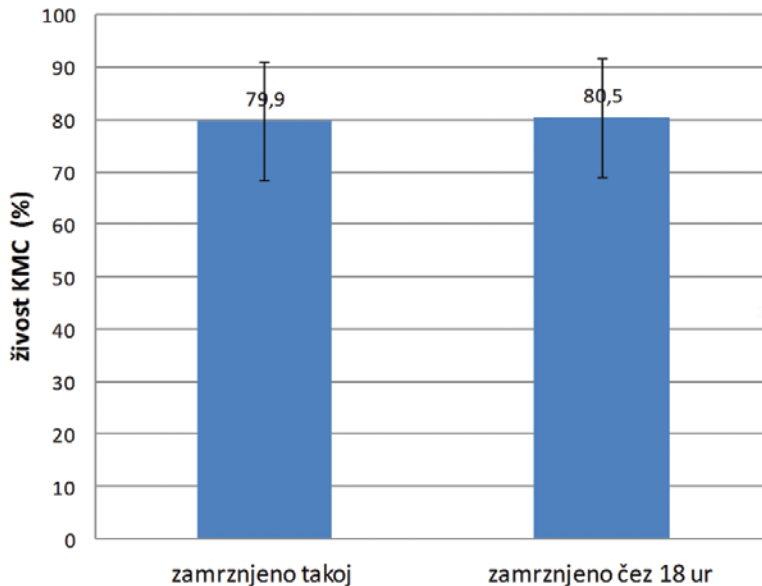
Bolnikom smo z aferezo zbrali celice in krvno plazmo na aparatu Amicus (Fresenius Kabi) in Cobe Spectra (Terumo BCT). Pripravke KMC smo zamrznili takoj po odvzemu ali pa smo jih do naslednjega dne shranili v hladilniku med 2 do 8 °C za 18 ur in nato zamrznili. KMC smo zamrznili v raztopini avtologne plazme in krioprotektorja DMSO (Cryosure, WAK Chemie Medical) z 10-odstotno končno koncentracijo DMSO-ja v dveh ali treh zamrzovalnih vrečkah s 40 do 150 ml končnega pripravka KMC (Cryocyte, Baxter; od leta 2011 naprej pa

CryoMACS, Miltenyi Biotec). Vrečke smo sterilno povezali s SCD-varilcem (Terumo), pretočili raztopino v več vrečk in zamrznili v programiranem zamrzovalniku (Nicoool freezal, Air Liquide) s programom: -1 °C/min. od 4 do $-5,5$ °C, -2 °C/min. od $-5,5$ do -40 °C ter -10 °C/min. od -40 °C do -130 °C. Celične pripravke smo prenesli v kovinske kasete in jih shranili v paro tekočega dušika (< -150 °C) v zamrzovalnike (Espace, Air Liquide).

Odmrzovanje in infuzija KMC

Pripravke KMC smo odmrznili ob bolnikovi postelji tako, da smo vrečke potopili v vodno kopel s sterilno fiziološko raztopino, ki je bila segreta na 37 ± 4 °C. Takoj ko se je pripravek odtajal (1,5 do 3,5 minut), smo vrečko priključili na sistem za dajanje kostnega mozga (Pharmagena, Bioprod). Infuzija je potekala od 2 do 10 minut. Po končani infuziji smo celice, ki so ostale v vrečki, sprali z 20 mL NaCl 9 mg/mL (fiziološka raztopina za infundiranje, Braun) in raztopino ponovno infundirali v bolnika. Ostanke smo ponovno dodali 20 mL fiziološke raztopine in vzorec uporabili za določanje živosti celic s pretočno citometrijo. Če smo bolniku presadili celice, ki so bile zamrznjene v več vrečkah po enem zbiranju celic, smo za analizo uporabili vzorec le iz ene vrečke. Ker je laboratorij, v katerem smo analizirali celice, v drugi stavbi kot Klinični oddelek za hematologijo oziroma Pediatrična klinika, kjer so potekale presaditve KMC, je od odmrznitve pripravka do začetka analize živosti celic preteklo od 30 do 90 minut.

Živost celic smo preverili tudi na 7 neodvisnih pripravkih KMC že preminulih bolnikov, ki so sicer bili namenjeni za presaditev (dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko 86/06/13). V tem primeru smo vrečke odmrznili v laboratoriju v vodni kopeli, vzeli vzorec in preverili živost takoj po odmrznitvi in eno uro pozneje, medtem smo vrečke hranili pri 22 °C. Ostanek celične suspenzije smo iztočili iz vrečke in vrečko sprali z 2 x po 20 mL fiziološke raztopine ter po eni uri pri 22 °C izmerili živost celic. Sprani vzorec smo pripravili zato, da smo posneli oko-



Slika 2: Primerjava živosti odmrznjenih pripravkov KMC, ki so bili zamrznjeni takoj ali pa naslednji dan. V ostankih celičnih suspenzij po presaditvi KMC smo izmerili živost KMC z barvilom 7-AAD. Podatki pomenijo povprečje ± SD. Povprečna živost celic v vzorcih, ki so bili zamrznjeni takoj po odvzemu, je bila 79,9 ± 9,2 % (n = 58) ali pa naslednji dan po 18 urah v hladilniku 80,5 ± 11,3 % (n = 67). Shranjevanje čez noč ni vplivalo na živost (t-test, P > 0,5).

lje pri pridobivanju vzorcev, ki so prihajali iz klinike.

Pretočna citometrija

Za določitev deleža neživih levkocitov (CD45 pozitivne celice) in KMC (CD34/CD45 pozitivne celice) v suspenziji smo celice obarvali z monoklonskimi protitelesi anti-CD34 in anti-CD45, konjugiranimi s fluorokromoma FITC (fluorescein izotiocianat) oziroma PE (fikoeritrin). Po dodatku barvila za mrtve celice 7-AAD (7-amino-actinomycin D) smo vzorec inkubirali 15 min v temi. Nato smo eritrocite lizirali z dodatkom pufru za lizo BD Pharm Lyse. Vse reagente smo pridobili od proizvajalca BD Biosciences. Takoj po 10-minutni inkubaciji v pufru za lizo smo vzorec analizirali s pretočnim citometrom FACSCalibur (BD Biosciences) s programom CellQuest Pro. Živost smo predstavili kot odstotni delež živih celic (7-AAD-negativne celice) v populaciji KMC oziroma v populaciji vseh levkocitov.

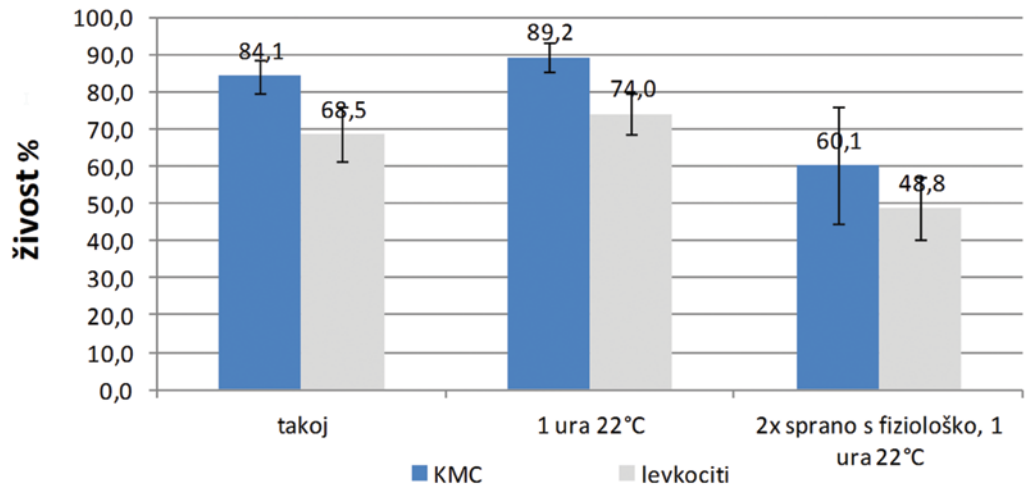
Statistična analiza

Podatke smo predstavili kot povprečje meritev s standardno deviacijo (SD) ter najnižjo in najvišjo izmerjeno vrednostjo. Podatke smo primerjali s t-testom in izračunali verjetnost (P) (Microsoft Excel).

Rezultati

V enem letu smo preverili živost celičnih pripravkov, ki so bili zamrznjeni v vrečkah v letih med 2008 in 2014 ter presajeni bolnikom v drugi polovici leta 2013 in prvi polovici leta 2014. Vse pripravke smo odmrznili brez zapletov, saj nobena vrečka ni bila poškodovana, napihnjena ali počena. Tudi med infuzijo pri bolnikih nismo opazili neželenih reakcij. Analizirali smo 88 vzorcev in ugotovili, da je bila povprečna živost KMC 79,9 ± 12,4 % (45,9–97,8 %), medtem ko je bila povprečna živost levkocitov 62,2 ± 12,2 % (34,7–84,6 %). Povprečna živost KMC je bila za 18 % večja od živosti levkocitov (parni t-test, P < 0,001) in se je statistično razlikovala (Slika 1). Živost celic pa se ni statistično razlikovala (t-test, P > 0,5) med vzorci, ki so bili zamrznjeni takoj po odvzemu 79,9 ± 9,2 % (44,7–94 %; n = 58) oziroma naslednji dan po 18 urah v hladilniku 80,5 ± 11,3 % (46–97 %; n = 67) (Slika 2).

Preverili smo tudi vpliv časa in prisotnosti fiziološke raztopine na samo merjenje živosti. Odmrznili smo 7 pripravkov, takoj preverili živost levkocitov in KMC, nato vsebino iztočili, vrečke sprali s fiziološko raztopino in čez 1 uro spet preverili živost celic (Slika 3). Živost KMC je bila takoj po odmrznitvi 84,1 ± 4,5 % (76,2–90,7 %), po eni uri na sobni temperaturi se je malo povečala, in sicer na 89,2 ± 3,9 % (83,2–93,3 %), in padla na 60,1 ± 15,7 % (36,9–83,6 %) pri razredčenih vzorcih s fiziološko raztopino v 1 uri pri 22 °C. Razlika v merjenju živosti KMC po eni uri je bila sicer statično značilna p < 0,05 (parni t-test, P = 0,03), toda pri levkocitih statistično značilne razlike ni bilo več (parni t-test, P = 0,06). Razredčeni vzorci so imeli v povprečju 29 % več mrtvih CD34+ celic (parni t-test, P < 0,01). Razlika je bila statistično značilna. Živost levkocitov je bila takoj po odmrznitvi 68,5 ± 7,4 % (57,1–77,2 %), po eni uri pri 22 °C je bila 74,0 ± 5,4 % (66,1–80,4 %) in padla na 48,8 ± 8,4 % (40,4–65,8 %) pri zredčenih vzorcih s fiziološko raztopino. Živost KMC je bila tudi v tem primeru višja od vseh levkocitov, in sicer za 16 % pri meritvi, ki je bila izvedena takoj po odmrznitvi vzorca (parni t-test, P < 0,01).



Slika 3: Vpliv časa in fiziološke raztopine na merjenje živosti celic v odmrznjenih pripravkih KMC. Vrečke smo odmrznili in del vzorca takoj analizirali, nato pa vsebino iztočili, vrečke sprali s fiziološko raztopino in preverili živost levkocitov in KMC z barvilom 7-AAD. Podatki pomenijo povprečje \pm SD na 7 vzorcih. Živost KMC je bila takoj po odmrznitvi $84,1 \pm 4,5$ %, po eni uri na sobni temperaturi se je malo povečala (parni t-test, $P = 0,03$), in sicer na $89,2 \pm 3,9$ %, in značilno padla (parni t-test, $P < 0,01$) na $60,1 \pm 15,7$ % pri vzorcih, spranih in redčenih s fiziološko raztopino. Živost levkocitov je bila takoj po odmrznitvi $68,5 \pm 7,4$ %, po eni uri na sobni temperaturi se je malo povečala na $74,0 \pm 5,4$ % (parni t-test, $P = 0,06$) in značilno padla (parni t-test, $P < 0,01$) na $48,8 \pm 8,4$ % pri spranih vzorcih.

Razpravljanje

Število in živost KMC se rutinsko določata po zbiranju celic, ne pa po odmrzovanju oziroma tik pred njihovo presaditvijo.¹² Večina laboratorijev določa število živih KMC s pretočno citometrijo po protokolu ISHAGE z uporabo monoklonskih protiteles anti-CD34 in anti-CD45 ter barvila za mrtve celice 7-AAD. Podoben postopek smo uporabili tudi pri naši raziskavi, le da nismo določali absolutnega števila živih celic, temveč le delež živih celic. Znano je, da zamrzovanje, shranjevanje, odmrzovanje, pranje oziroma odstranjevanje DMSO-ja, vrsta celic in način določanja živosti celic vpliva na izkoristek in živost celic.^{14,15} Določanje živosti s tripanskim modrilom poveča rezultat tudi za 12,8 % v primerjavi z metodo 7-AAD, kar so pred kratkim dokazali s študijo na 38 odmrznjenih pripravkih KMC.¹⁶ V naši raziskavi smo pokazali, da so KMC bolj »trdožive« oziroma bolje prenašajo zamrzovanje in odmrzovanje od levkocitov, saj jih je po odmrzovanju preživelo v povprečju 18 % več, in sicer 79,9 % KMC v primerjavi z 62,2 % levkocitov. Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi, ko jim je iz odmrznjenih pripravkov KMC uspelo pridobiti 17 % več živih KMC, kot je bilo živih levkocitov.¹⁴

Tudi Laroche je objavil, da je delež živih levkocitov (69 %) po odtajanju manjši kot delež živih KMC (83 %).¹⁷

V raziskavi smo tudi ugotovili, da je delež živih KMC v odmrznjenih pripravkih od 79,9 do 84,1 %, kar je primerljivo z živostjo od 71 do 83 %, kakor poročajo drugi.^{15,17,24,25} Z dodatnimi postopki pranja odmrznjenih pripravkov, s katerimi zmanjšamo koncentracijo DMSO-ja, se izguba živih KMC še povečuje in je lahko med 10 in 50 %.¹⁷⁻²³ V našem primeru do dodatnih izgub celic ni prišlo, saj so bili vsi pripravki presajeni takoj po odmrznitvi, ne da bi jim prej s spiranjem celic odstranili DMSO. Pri vzorcih, ki so prihajali s klinike na analizo v laboratorij, moramo tudi upoštevati, da so bili redčeni s fiziološko raztopino in da je bila analiza živosti izvedena tudi do 90 minut po odtajanju, kar tudi zmanjšuje delež živih celic, kakor smo dokazali. Opazili smo tudi, da se je živost celic po 1 uri na sobni temperaturi po odmrzovanju pripravkov malo zvišala, kar pa ne pomeni, da je bilo po eni uri več živih celic, saj absolutnega števila živih celic nismo določili. Yang je v študiji dokazal, kako pomembna je razlika v merjenju izkoristka živih celic, ki vključuje tudi določanje absolutnega števila celic, in živostjo oziroma

preživetjem.¹⁴ Ugotovil je, da se izkoristek živih celic s časom zmanjšuje, živost pa ostane približno enaka, in sklepa, da mrtve celice sčasoma agregirajo oziroma lizirajo in se pri analizi živosti izmuznejo iz štetja celic.

Včasih se zgodi, da se zbiranje KMC zavleče pozno popoldne, zato tak pripravek shranimo čez noč v hladilnik in zamrzujemo naslednji dan. Rezultati naše raziskave so pokazali, da tako shranjevanje ne vpliva na živost KMC, saj je bila živost 80,5-odstotna v pripravkih, ki so bili zamrznjeni naslednji dan, primerljiva z živostjo 79,9 % pri pripravkih, ki so bili zamrznjeni takoj po odvzemu celic. Študija Parkins s sod. pa je pokazala, da navedeno shranjevanje tudi ne vpliva na prijetje presadka po presaditvi.²⁶ Ugotovili smo tudi, da spiranje oziroma redčenje odmrznjenih vzorcev KMC s fiziološko raztopino slabo vpliva na živost celic, saj se je populacija živih celic CD34+ v povprečju zmanjšala za tretjino, najnižjo živost smo izmerili 36,9 %. Znano je sicer, da odmrznjene celice hitro propadejo zaradi osmotskega šoka, ki nastane, če celice takoj razredčimo z medijem, ki se zelo razlikuje v osmolarnosti od medija, v katerem so bile zamrznjene.^{27,28} Fiziološka raztopina (0,9-odstotni NaCl) ima 308 mOsm/l, zamrzovalna raztopina z 10-odstotnim DMSO pa ima več kot 1280 mOsm/l. Ker KMC bolje prenašajo zamrzovanje in odmrzovanje od levkocitov, je merjenje živosti celic CD34+ primernejša metoda kot merjenje živosti vseh levkocitov, če želimo preverjati kakovost odmrznjenih pripravkov KMC, ki jih presadimo takoj po odmrzovanju brez odstranjevanja DMSO. Kakovost pripravkov lahko preverjamo tudi

tako, da določimo razmnoževalni potencial KMC *in vitro*. V tem primeru celice razmnožujemo v ustreznem gojišču in določimo število klonogenih celic (CFU). Ta metoda je sicer zamudnejša, saj je treba celice razmnoževati vsaj 14 dni, da lahko preštejemo kolonije. S trenutnim rutinskim postopkom merjenja živosti celic (7-AAD) določimo le delež mrtvih oziroma pozno apoptotičnih celic, ne pa celic v fazi zgodnje apoptoze, ki je nepovraten proces. Za natančnejšo opredelitev števila funkcionalnih celic v odtajnem pripravku bi bilo zato smiselno preveriti še apoptotičnost celic. V literaturi lahko preberemo, da je v odmrznjenih pripravkih KMC lahko od 30–37 % apoptotičnih celic CD34+.²⁴⁻²⁵

Zaključki

Vsi trije procesi (zamrzovanje, shranjevanje in odmrzovanje celičnih pripravkov) pomembno vplivajo na kakovost oziroma živost celic, saj je ustrezno število živih presajenih KMC nujno za prijetje presadka. Ker v našem laboratoriju pri zamrzovanju in odmrzovanju propade v povprečju 20 % KMC, priporočamo, da se pri načrtovanju zbiranja KMC ta izguba celic upošteva. Zamrzovanje pripravkov KMC po 18 urah od odvzema celic ne vpliva na živost odmrznjenih celic v primerjavi s takoj zamrznjenimi pripravki. Fiziološka raztopina ni primerna za spiranje vrečk in shranjevanje ostanka KMC po odmrznitvi pripravkov KMC. Naši standardni postopki zamrzovanja, shranjevanja in odmrzovanja pripravkov so dobri in primerljivi z drugimi.

Literatura

1. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009; 76: 18–26.
2. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion* 2005; 45: 613–21.
3. Krašna M, Telebak T, Domanović D. Analysis of cord blood units donated to the Slovenian cord blood bank. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 451–455.
4. Keeney M, Gratama JW, Sutherland DR. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry A.* 2004; 58: 72–5.
5. Demirel T, Buckner CD, Bensinger WI. Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 1996; 14: 106–16.
6. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW *et al.* Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 1995; 86: 4437–4445.
7. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, *et al.* Hematopoietic

- stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA* 2010; 303: 1617–24.
8. Slovenija-transplant. Mesečna statistika presaditve krvotvornih matičnih celic (KMC) 2013. Dosegljivo 1.9.2014 s spletne strani: http://www.slovenija-transplant.si/fileadmin/SlikovniMaterial/Dejavnost/KMC_December_2013.pdf.
 9. Zver S. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 465–74.
 10. Jazbec J, Rajić V, Karas-Kuželički N. Levkemije otroške dobe. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 1–25–30.
 11. Zver A, Zver S, Mlakar U, Preložnik-Zupan I, Pretnar J. Zdravljenje bolnikov z diseminiranim plazmocitomom s tandemsko avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 1–75–80.
 12. Rosskopf K, Ragg SJ, Worel N, Grommé M, Preijers FW, Braakman E, et al. Quality controls of cryopreserved haematopoietic progenitor cells (peripheral blood, cord blood, bone marrow). *Vox Sang* 2011; 101: 255–75.
 13. McGregor M, Baier D, Duffy M, Graf A, Hutchins C, Philippe J, et al. WMDA Guidance on setting a temperature specification for the transit of HSC donations. World Marrow Donor Association 2010. Dosegljivo 1.9.2014 s spletne strani: http://worldmarrow.org/fileadmin/Committees/QAWG/20101104-QAWG-INFO-HPC_Transit_specification.pdf
 14. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, McGann LE. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32: 1021–6.
 15. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion* 2001; 41: 667–73.
 16. Winter JM, Jacobson P, Bullough B, Christensen AP, Boyer M, Reems JA. Long-term effects of cryopreservation on clinically prepared hematopoietic progenitor cell products. *Cytotherapy* 2014; 16: 965–75.
 17. Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion*. 2005; 45: 1909–16.
 18. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35: 881–7.
 19. Yang H, Zhao H, Acker JP, Liu JZ, Akabutu J, McGann LE. Effect of dimethyl sulfoxide on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood. *Cryobiology* 2005; 51: 165–75.
 20. D'Rozario J, Parisotto R, Stapleton J, Gidley A, Owen D. Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2014; 50: 443–50.
 21. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, Sutherland DR, Chin-Yee IH. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 967–72.
 22. Castelhana MV, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA, Lorand-Metze I. Quantifying loss of CD34+ cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfus Apher Sci*. 2013 Apr; 48(2): 241–6.
 23. Scerpa MC, Daniele N, Landi F, Caniglia M, Cometa AM, Ciammetti C, Rossi C, Locatelli F, Isacchi G, Zinno F. Automated washing of human progenitor cells: evaluation of apoptosis and cell necrosis. *Transfus Med*. 2011; 21: 402–7.
 24. De Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, Kessler FL, van der Wall E, Jonkhoff AR, et al. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for hematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 249–55.
 25. Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27: 487–98.
 26. Parkins MD, Bahlis N, Brown C, Savoie L, Chaudhry A, Russell JA, et al. Overnight storage of autologous stem cell apheresis products before cryopreservation does not adversely impact early or long-term engraftment following transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38: 609–14.
 27. Schaefer UW, Schmidt CG, Dicke KA, van Bekkum DW, Schmitt G. Cryopreservation of hemopoietic stem cells. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*. 1975; 83: 285–91.
 28. Song YS, Moon S, Hulli L, Hasan SK, Kayaalp E, Demirci U. Microfluidics for cryopreservation. *Lab Chip* 2009; 9: 1874–81.