

Opredelitev krvotvornih matičnih in predniških celic v pripravkih za presaditev

Characterisation of haematopoietic stem and progenitor cells in products intended for transplantation

Elvira Maličev, Metka Krašna

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Elvira Maličev, e: elvira.malicev@ztm.si

Ključne besede:

krvotvorne matične celice; celice CD34+; celični pripravki; pretočna citometrija; CFU-test

Key words:

hematopoietic stem cells; CD34+ cells; cell products; flow cytometry; CFU assay

Prispelo: 7. 6. 2016

Sprejeto: 3. 12. 2017

Izvleček

Avtologne in alogenske presaditve krvotvornih matičnih celic in predniških celic se izvajajo že vrsto let. Pripravki celic za presaditev so lahko različni, odvisni od vrste zdravljenja. Zbiranje, koncentriranje in shranjevanje matičnih celic se nadzoruje z laboratorijskimi kvantitativnimi in kvalitativnimi testi. Podatki o številu, živosti in funkcionalnosti matičnih celic ter čistosti pripravka zagotavljajo varnost uporabe in prispevajo k napovedi uspešnosti presaditve. Krvotvorne matične in predniške celice za rutinsko uporabo se identificirajo na podlagi molekule CD34, vendar je skoraj 50 let raziskovanja na tem področju razkrilo veliko heterogenost teh celic. To bi v prihodnosti omogočilo identificiranje, ločevanje in uporabo subpopulacij celic z različnim krvotvornim potencialom.

Abstract

Haematopoietic stem and progenitor cells have been successfully used for autologous and allogeneic transplantations for many years. Quantitative and qualitative laboratory assays allow controlling different cellular products during collection, concentration and preservation. The information about cell number, viability, functionality and purity of the graft ensure safe application and help predict the likelihood of successful engraftment. Almost 50 years of research have disclosed the great heterogeneity of cells that exhibit a haematopoietic differentiation potential. This will enable the identification of subpopulations within the population of CD34-positive haematopoietic stem cells.

Citirajte kot/Cite as: Maličev E, Krašna M. Opredelitev krvotvornih matičnih in predniških celic v pripravkih za presaditev. Zdrav Vestn. 2018;87(1-2):58-68.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.1602

1. Uvod

S pojmom transfuzija označujemo predvsem uporabo pripravkov zrelih krvnih celic (izjema je krvna plazma), najpogosteje eritrocitov in trombocitov. Te celice le začasno nadomestijo krvne celice v krvnem obtoku, saj se ne pomnožujejo in imajo sorazmerno kratko življenjsko dobo. Za razliko od transfuzije

zrelih krvnih celic pa gre pri celičnem zdravljenju za vnos krvotvornih matičnih in predniških celic (KMC), ki naj bi poskrbele za trajno tvorbo zrelih celic. Matična celica je nediferencirana celica s sposobnostjo asimetrične delitve, pri čemer ena hčerinska celica ostane nediferencirana, iz druge hčerinske celice

pa nastane linijsko usmerjena predniška celica, ki se med celičnimi delitvami diferencira do zrele celice.

Tako kot pri pripravkih zrelih krvnih celic, je potrebno tudi pri pripravi KMC za presaditev postopke odvzema, koncentriranja, shranjevanja in prenosa čim bolj standardizirati, optimizirati in validirati v skladu z veljavno zakonodajo (Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje), pri tem pa potrebujemo zanesljive laboratorijske teste za opredelitev celičnega pripravka (1).

2. Krvotvorne matične in predniške celice v pripravkih za presaditev

Od presaditve prvih KMC, ki so jih pridobili iz kostnega mozga, je minilo že več kot pol stoletja. Od takrat se je ta postopek razširil za zdravljenje malignih in nemalignih hematoloških bolezni. Odvzem kostnega mozga je v večini primerov nadomestilo zbiranje KMC iz periferne krvi po stimulaciji bolnika ali darovalca s citokini (npr. G-CSF), ki pospešijo migracijo KMC iz kostnega mozga v periferno kri. KMC lahko po odvzemu na različne načine procesiramo: odstranimo jim eritrocite, limfocite T (pri alogenskih presaditvah), lahko jih zamrzujemo in odmrzujemo, spiramo, zmanjšamo volumen na količino, ki je primernejša za shranjevanje in presaditev, lahko jih koncentriramo s postopkom imunskega ločevanja celic. Vsak od teh korakov lahko vpliva na kakovost končnega pripravka KMC, zato z različnimi testi spremljamo spremembo števila celic, njihovo živost in funkcionalnost. Te teste razdelimo v dve večji skupini: na fenotipske teste in funkcijske teste. S fenotipskimi testi analiziramo izražene lastnosti celic, najpogosteje so to prisot-

nost specifičnih proteinov na površini celic, t.i. celičnih označevalcev. Šele ko KMC identificiramo, jih lahko tudi preštejemo. Funkcijski testi pa merijo biološke lastnosti celic, kot so zmožnost pomnoževanja ali diferenciacije celic v zrele celice.

3. Fenotipske analize krvotvornih matičnih in predniških celic

Hematopoeza se prične z asimetrično delitvijo krvotvorne matične celice, ki jo spodbudijo različni okoljski dejavniki. Postopoma in preko različnih predniških celic nastaja zrela krvna celica (2,3). Dozorevanje krvne celice se natančno kontrolira z izražanjem specifičnih genov in njihovih produktov, kar se zrcali na morfoloških in funkcionalnih spremembah celice. Novo nastali proteini lahko služijo kot receptorji za rastne dejavnike, so adhezijske molekule, encimi ali signalne transdukcijske molekule, za številne molekule pa njihove vloge še ne poznamo. Nekateri od teh antigenov so značilni za določeno celično linijo, medtem ko se drugi lahko izražajo na različnih vrstah celic. Celice se lahko med seboj razlikujejo tudi glede na količino določenega antigena. S pomočjo antigenov oziroma celičnih označevalcev tako celice identificiramo in jih ločimo od drugih celic (4,5).

4. Celični označevalci ter določanje koncentracije celic

Od začetka uporabe KMC za zdravljenje se je za oceno njihove koncentracije uporabljal podatek o koncentraciji vseh celic oziroma vseh enojedrnih celic v pripravku. Ta povezava temelji na predpostavki, da se ob povečanju celokupnega števila celic poveča tudi števi-

lo matičnih in predniških celic. Potrdili so, da se ti podatki v veliki meri ujema-jo z uspešnostjo presaditve KMC (6). A šele odkritje, da krvotvorne matične in predniške celice na površini izražajo molekulo CD34, je omogočilo njihovo neposredno prepoznavanje in štetje (7). Antigen CD34 je transmembranski glikoprotein velikosti 104–120 kDa, ki pripada adhezijskim molekulam sialomucinom. Celice, označene s protitelesi proti antigenu CD34, preštejemo s pretočnim citometrom, kar je trenutno edini način določanja koncentracije matičnih celic (8). Da bi se štetje KMC čim bolj standardiziralo, je združenje International Society for Hematotherapy and Graft

Engineering (ISHAGE) predlagalo enoten postopek za označevanje celic CD34+ v različnih vzorcih (periferna kri, kostni mozeg, popkovnična kri) ter postopek za njihovo večstopenjsko analizo z metodo pretočne citometrije (9). S to metodo pridemo do rezultata dokaj hitro in terapevtski potencial celičnega pripravka natančneje napovemo (6,10). Kljub temu je na tem mestu potrebno poudariti nekaj dejstev. Izražanje molekul CD34 se lahko spremeni, če so celice izpostavljene različnim pogojem *ex vivo* (11). Poleg tega postopek ISHAGE ne upošteva prisotnosti apoptotičnih celic, kar je pomembno predvsem pri zamrzovanju in odmrzovanju ter prevozu

Tabela 1: Pregled najpogosteje uporabljenih označevalcev za fenotipsko opredelitev krvotvornih matičnih celic in njihovih subpopulacij.

	Vrsta testa/ kombinacija označevalcev pripadnosti	Literatura
Določanje koncentracije KMC celic	štetje enojedrnih celic s hematološkim analizatorjem	Stewart s sod., 1995 (18)
	celice CD34+CD45 ^{Low} (heterogena populacija celic s krvotvornimi matičnimi celicami)	Donnenberg s sod., 2002 (19); Sasnoor s sod., 2003; (21) Fisher s sod., 2014 (20); Kresnik s sod., 2016 (8)
Določanje subpopulacij KMC	celice CD34+CD38- (primitivna populacija celic brez izraženih diferenciacijskih označevalcev); celice CD34+CD38+ (heterogena populacija z mieloblasti, eritroblasti, limfoblasti)	Terstappen s sod., 1991 (22); Bhatia s sod., 1997 (23)
	celice Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- (primitivna populacija celic odgovorna za dolgoročno repopulacijo); celice CD34+CD38-CD90-Lin- (kratkoročna repopulacija)	Weissman in Shizuru, 2008 (24)
	celice CD34-CD38-Lin- celice; CD34+CD38-Lin-; celice CD34+CD38-Lin- Rho123 ^{Low} ; celice CD34+CD38-Lin- CD45RA-Rho123 ^{Low} CD49f (različno dolgo prijetje presadka pri miših)	Dooley s sod., 2004 (25); McKenzie s sod., 2007 (26); Notta s sod., 2011 (27)
	celice CD34+CD117+ (več CFU-GM) in celice CD34+CD117 ^{Low} (več BFU-E); celice CD34+CD33-CD38-Rho- in CD34+CD33-CD38- (različno velike populacije limfo-mieloidnih predniških celic)	Gunji s sod., 1993 (28); Liu in Verfaillie, 2002 (29)
	celice CD34-CD133+ (predhodnice celic CD34+CD133+)	Yin s sod., 1997 (30); Gallacher s sod., 2000 (16); Mizrak s sod., 2008 (17); Takahashi s sod., 2014 (31)
	celice CD133+CD34+CD45RA- (multipotentne predniške) celice CD133+CD34+CD45RA+ (limfo-mieloidne predniške); celice CD133 ^{Low} CD34+CD45RA- (eritro-mieloidne predniške)	Radtke s sod., 2015 (32)

celičnih pripravkov. Celice so namreč v zgodnjih stopnjah procesa apoptoze nedovzetne za barvila, s katerimi obarvamo mrtve celice. Zato bi lahko v teh primerih določili večje število živih celic CD34+, kot jih je dejansko prisotnih v analiziranem vzorcu (12).

Antigen CD34 pogosto in napačno povezujemo le s KMC in obratno (13). Ta molekula se izraža tudi na drugih celicah, kot so na primer epitelne in endotelne celice. Na splošno je v kostnem mozgu, popkovnični krvi in periferni krvi populacija celic CD34+ zelo heterogena, zato je napačno enačiti celice CD34+ s krvotvornimi matičnimi celicami. V popkovnični krvi ima le približno polovica izmed celic CD34+ tudi funkcionalne lastnosti KMC. Ugotovili so tudi, da je izražanje tega proteina lahko reverzibilno in ne vpliva na funkcionalne sposobnosti celice. Poleg tega, da večina KMC izraža antigen CD34, so dokazali tudi populacijo KMC, ki so negativne za celični označevalec CD34. Te celice CD34- naj bi bile primitivnejše matične celice od celic CD34+, oziroma naj bi šlo za predhodnice celic CD34+ (14,15).

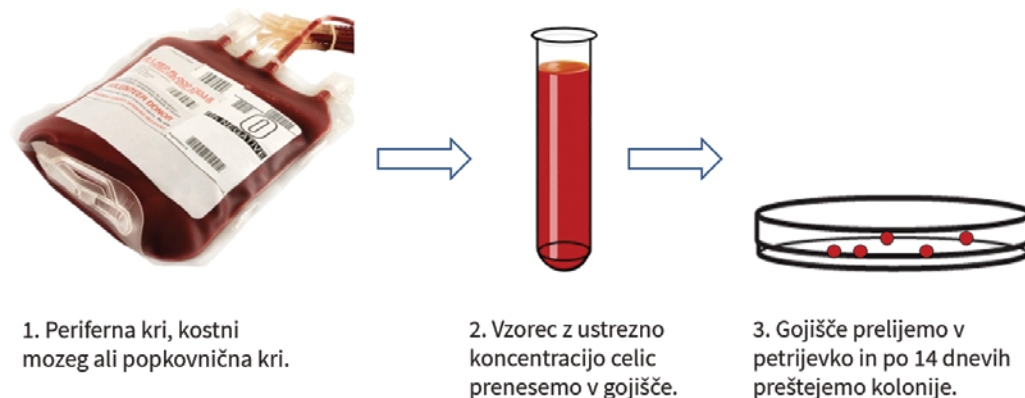
V rutinski praksi je identifikacija KMC s pomočjo protiteles anti-CD34 še vedno najpogostejša, tako za štetje KMC kot tudi za njihovo koncentriranje. Tako je tudi v Sloveniji: na Kliničnem oddelku za hematologijo in Zavodu RS za transfuzijsko medicino. V različnih raziskavah pa se pojavljajo označevalci in kombinacije označevalcev, ki bi lahko nadomestili označevalec CD34 oziroma bi ločevali med subpopulacijami celic CD34+. Tako na primer označevalec CD133 ali prominin-1, ki se izraža tako pri celicah CD34+ kot CD34-, označuje primitivnejše KMC, njihovo učinkovitost proučujejo v različnih kliničnih raziskavah. Te celice naj bi bile bolj klonogene in naj bi omogočale dolgoročno prijete presadka (16,17).

Nekateri drugi označevalci za KMC so zbrani v Tabeli 1.

V mešanici KMC bi se s pomočjo različnih označevalcev lahko izločila subpopulacija KMC z najprimernejšimi proliferacijskimi in diferenciacijskimi lastnostmi celic za določeno zdravljenje. Pri nas v raziskovalne namene KMC uporabljamo označevalce CD34, CD184, CD133, CD90, CD166, CD117, CD146 in CD105.

5. Funkcijske analize krvotvornih matičnih in predniških celic

Fenotipske analize celic CD34+ so običajno hitre, a žal ne podajo podatka o biološkem potencialu KMC, njihovo izmerjeno število je lahko pretirano, posebno pri odmrznjenih pripravkih (33). KMC lahko dodatno identificiramo z enim od funkcijskih testov, saj s tem natančneje opredelimo njihove migracijske, proliferacijske ali diferenciacijske sposobnosti. V raziskovalne namene ali za kontrolo kakovosti celičnih pripravkov po obdelavi in odmrzovanju najpogosteje merimo število funkcionalnih matičnih celic, sposobnih tvorbe kolonij krvotvornih celic. To so klonogeni ali CFU (*angl.* Colony-Forming Unit) testi. Vsaka kolonija namreč nastane iz ene predniške celice ali ene CFU. Nastajajoče kolonije lahko spremljamo *ex vivo* ali *in vivo*. V klasičnem CFU-testu pripravimo celično kulturo v 35 mm petrijevki z gojiščem, ki vsebuje ustrezne rastne dejavnike za KMC. V 14–21 dneh kolonije dosežejo določeno velikost in obarvanost, zato so primerne za opazovanje in štetje z mikroskopom. Poznamo različne klonogene teste (Tabela 2) za: BFU-E (*angl.* Burts Forming Unit Erythroid), CFU-GM (*angl.* Colony Forming Unit Granulocyte/Macrophage), CFU-



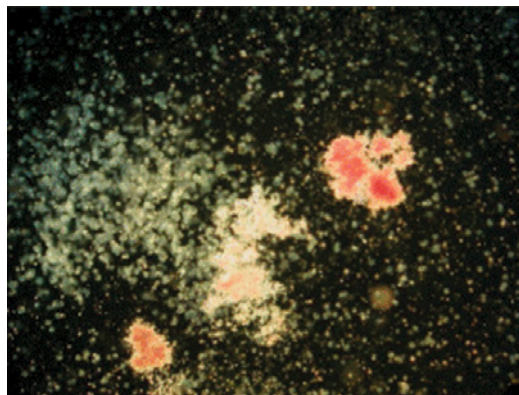
Slika 1: Postopek izvedbe CFU-testa, s katerim določimo število krvotvornih matičnih in predniških celic, ki so sposobne tvorbe kolonij.

GEMM (*angl.* Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Macrophage/ Megakaryocyte), CFU-S (*angl.* Colony-Forming Unit Spleen), ki v obsevanih miših v vranici tvorijo mieloidne kolonije in LTC-IC (*angl.* Long-Term Culture-Initiating Cells). Testi za CFU-S in testi prijeteja presadka v NOD/SCID miših so bolj prefinjeni, zato se uporabljajo predvsem v raziskavah.

Klonogeni testi matičnih celic se po priporočilu NetCord-FACT International standards for cord blood

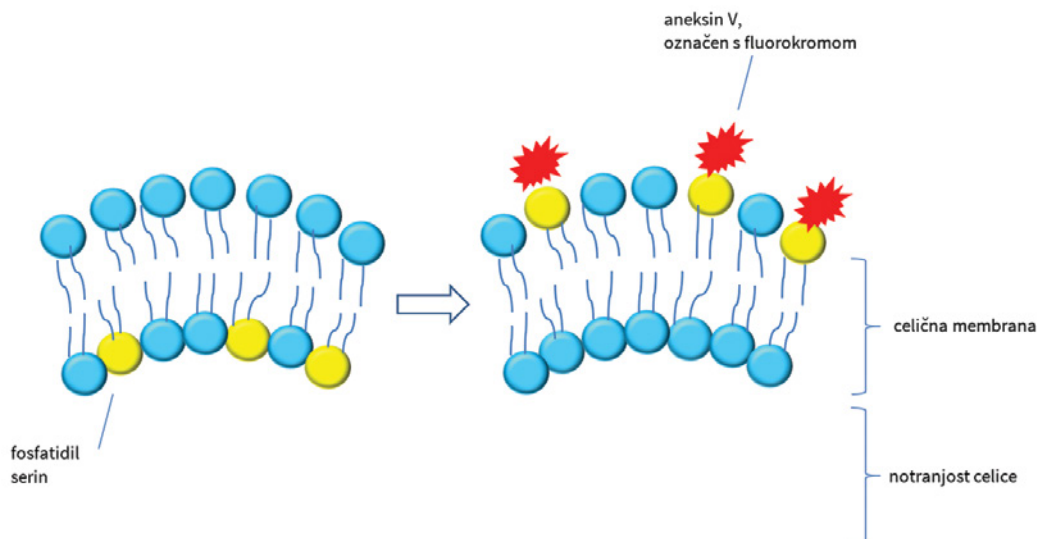
collection, banking, and release for administration redno uporabljajo v bankah popkovnične krvi. Če iz vzorca celičnega pripravka, ki je namenjen trajni presaditvi, ne uspemo pomnožiti celic in dokazati kolonij, potem pripravek ni primeren za klinično uporabo. Za ostale pripravke uporabljamo CFU-test občasno, na primer za preverjanje ustreznosti postopkov obdelave pripravkov in samega shranjevanja v tekočem dušiku.

6. Določanje nekrotičnosti in apoptotičnosti v celičnih pripravkih



Slika 2: Svetlobna mikroskopija kolonij po CFU-testu: tri rdeče obarvane eritroidne kolonije (BFU-E) in ena belo obarvana granulocitno-makrofagna kolonija (CFU-GM).

Nekroza je patološka celična smrt, ki nastopi zaradi ekstremnih sprememb v okolju. Ker ob tem pride do poškodbe celične membrane, lahko v celico poleg vode in ionov vdrejo tudi barvila, na podlagi katerih mrtve celice ločimo od živih. Apoptoza je ključna pri razvoju in delovanju organizma, saj se organizem s tem znebi odvečnih celic. Apoptozo sproži pomanjkanje ali prisotnost določenih rastnih dejavnikov, pa tudi dejavniki iz okolja, ki poškodujejo DNA, kot so prosti radikali, različni virusi, obseva-



Slika 3: Označevanje apoptotičnih celic. Med apoptozo se molekule fosfatidilserina prestavijo iz citosolne plasti celične membrane v zunajcelično plast. Ob prisotnosti Ca^{2+} ionov se na izpostavljene fosfatidilserine veže protein aneksin V, ki je označen s fluorokromom.

nje. Apoptozo celic *ex vivo* lahko sproži sprememba temperature, prisotnost ali odsotnost določenih snovi v gojiščih za celice ali zamrzovalnih raztopinah.

Barvanje citoplazme mrtvih celic s tripanskim modrilom je bil eden prvih načinov določanja živosti ali viabilnosti celic v laboratoriju (34,35). Za ločevanje živih od mrtvih celic se uporabljajo tudi fluorkromi, kot so propidijev jodid (PI) (34) in 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) (8,12,35), ki se po vstopu v nekrotične ali pozno apoptotične celice vežejo na nukleinske kisline. V rutinski uporabi se najpogosteje uporablja fluorokrom 7-AAD.

Dobra plat testov viabilnosti je ta, da so hitri: v večini primerov je dovolj že do 10-minutna izpostavljenost barvilu. Slaba plat pa je ta, da se nam celice v zgodnjih fazah apoptoze največkrat izmuznejo, ker barvil še ne prepuščajo. Zato apoptozo določamo na podlagi drugih celičnih sprememb, kot je na primer porušitev membranske asimetrije. Molekule fosfatidilserina, ki se nahajajo

v citosolnem delu celične membrane, se na začetku apoptoze začnejo premeščati v zunajcelično plast celične membrane, kjer služijo kot signal za prepoznavanje in odstranitev z makrofagi. Aneksini se v prisotnosti kalcijevih ionov lahko vežejo na izpostavljeni fosfatidilserin, zato apoptotične celice, obarvane s fluorescenčno označenim aneksinom ločimo od mrtvih (Slika 1). Spremembam, ki se dogajajo med apoptozo, sledimo tudi s testom fragmentacije DNA, merjenjem aktivnosti kaspaz, merjenjem membranskega potenciala mitohondrijev, sproščanjem citokroma C in drugimi postopki. Katero vrsto testa izberemo, je odvisno od vrste celic. Za krvotvorne matične celice pa se najpogosteje uporablja označevanje z aneksinom V.

7. Pripravi krvotvornih matičnih celic po citaferezi

Citaferenza je postopek zbiranja krvnih celic s celičnim ločevalnikom, ki odvzame polno kri ter izloči zelene krvne ce-

lice, ostale sestavine pa postopno vrača v krvni obtok. S tem postopkom zbiramo KMC v levkocitni pripravek, kjer se nahaja tudi preostanek eritrocitov, granulocitov in trombocitov. Koncentracija KMC v periferni krvi bolnika pred in po citaferezi ter v levkocitnem pripravku se določa s pretočno citometrijo po standardnem postopku (ISHAGE). Celice se označijo s protitelesi proti celičnima označevalcema CD34 in CD45. Količino KMC izrazimo tudi v % glede na celokupno število levkocitov, ki ga izmerimo s hematološkim analizatorjem ali s pretočnim citometrom. Delež celic CD34+ v levkocitnih pripravkih bolnikov, ki smo jih zbrali s celičnim ločevalnikom, je 0,09–2 %, v povprečju 0,7 %. Tako zbrane celice se v Sloveniji uporabljajo za zdravljenje različnih bolezni na podro-

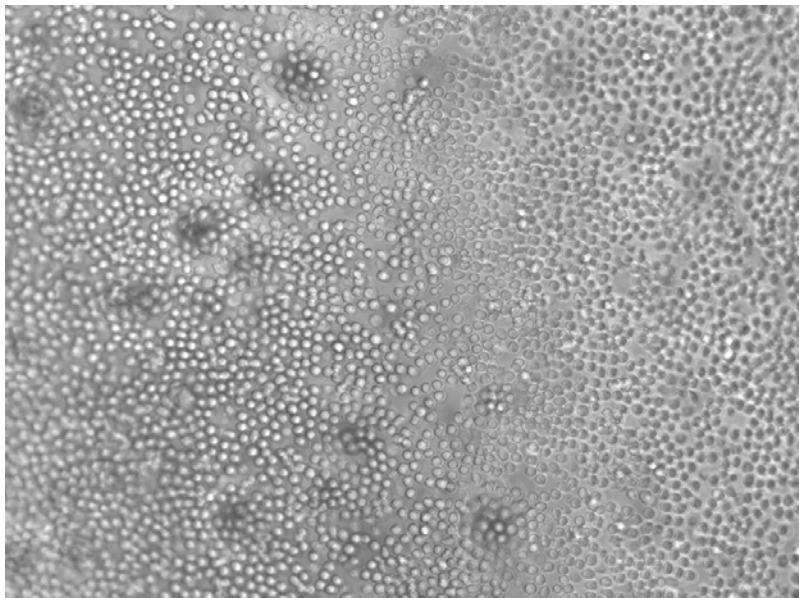
čju hematologije, onkologije in kardiologije (8,47,48,49).

8. Odmrznjeni pripravki krvotvornih matičnih celic

Pri analizi odmrznjenih celičnih pripravkov s pretočno citometrijo moramo postopke prilagoditi. Mrtve celice v vzorcu lahko motijo meritev in dajo napačen rezultat zaradi nespecifične vezave protiteles. Zaradi povečanja ozadja fluorescence se lahko zgodi, da šibko pozitivnih celic ne vidimo. Poleg tega mrtve celice sproščajo DNA, ki je lepljiva in povzroči nastajanje skupkov celic, ki ovirajo analizo. Zamrznjeni pripravki poleg KMC vsebujejo tudi druge krvne celice. Problematični so predvsem granulociti, ki te oblike zamrzovanja ne

Tabela 2: Pregled funkcijskih testov za opredelitev KMC in njihovih subpopulacij.

	Vrsta testa	Literatura
Določanje viabilnosti/apoptotičnosti celic	Tripansko modrilo	Mascotti s sod., 2000 (34); Xiao in Dooley, 2003 (35);
	Propidium jodid	Mascotti s sod., 2000 (34)
	7-amino-aktinomicin D	Xiao in Dooley, 2003 (35); Krašna s sod., 2015 (12); Kresnik s sod., 2016 (8)
	SYTO16 test	Sparrow s sod., 2006 (36)
	ToPro-3	López in Lawrence, 2008 (37)
	Aneksin V	Anthony s sod., 1998 (38); Xiao in Dooley, 2003 (35)
Klonogeni testi	CFU	Weissman in Shizuru, 2008 (24); Radke s sod., 2013 (39)
	CFU-sd12, CFU-GM, CFU-GEMM	Balint s sod., 1999 (40); Matsumoto s sod., 2002 (41)
	BFU-E	Balint s sod., 1999 (40); Buchanan, 2004 (42)
	LTC-IC	Barker in Wagner, 2003 (43); Ito s sod., 2010 (44)
Testi <i>in vivo</i>	NOD/SCI miši	Valeri in Pivacek, 1996 (45); Halle s sod., 2001 (46)



Slika 4: Svetlobna mikroskopija pripravka celic CD34+ po imunomagnetnem ločevanju. V povprečju je v pripravku več kot 95 % celic CD34+ (velikosti 7–8 µm).

preživijo. Celokupno število levkocitov v odmrznjenem pripravku je zato manjše kot pred zamrzovanjem. Zato se spremeni tudi delež celic CD34+, ki se običajno izračuna glede na število levkocitov. Zato je v odmrznjenih pripravkih potrebno ponovno določiti koncentracijo CD34+ s pomočjo kroglic za štetje in ne samo določati delež mrtvih celic. Hkrati je priporočljivo preveriti tudi apoptotičnost celic. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino smo ocenili, da pri odmrzovanju pripravkov KMC, ki so shranjeni v naši kriobanki in so namenjenih za avtologno presaditev, v povprečju propade 20 % celic CD34+, kar je primerljivo z drugimi laboratoriji, ki pripravljajo celične pripravke za klinično uporabo (12). Vse celice ne preživijo zamrzovanja in odmrzovanja, saj jih poškoduje osmotski šok ob dodatku krioprotektorja pri procesu zamrzovanja in kristali ledu, ki poškodujejo membrane. Ker je delež mrtvih celic po odmrzovanju pričakovan, to upoštevamo že na začetku pri samem zbiranju

celic. Po drugi strani pa smo ugotovili, da se živost krvotvornih matičnih celic v zamrznjenih pripravkih, ki so dalj časa shranjeni v tekočem dušiku, skoraj ne zmanjšuje. Zato tudi standardi, ki določajo pripravo celičnih pripravkov ne omejujejo rok uporabnosti zamrznjenih pripravkov (50,51).

9. Pripravki koncentriranih krvotvornih matičnih celic

V nekaterih primerih za zdravljenje potrebujemo KMC, ki so zbrane v manjšem volumnu pripravka oziroma v takšni obliki, da ne vsebujejo drugih krvnih celic. Takrat se celice CD34+ po citaferezi še dodatno koncentrirajo (8,12). Ker so KMC po velikosti in specifični teži podobne levkocitom, jih s centrifugiranjem ne moremo osamiti, zato uporabimo postopek ločevanja celic, ki temelji na vezavi ustreznih protiteles v magnetnem polju. Celice bi lahko koncentrirali tudi s posebnim pretočnim citometrom – celičnim ločevalnikom (*angl.* cell sorter), vendar je trenutno za pripravke, namenjene zdravljenju, primernejše imunomagnetno ločevanje celic, ker zagotavlja aseptičnost priprave. Pri »pozitivnem« imunomagnetnem ločevanju protitelesa, ki so označena z železnimi nanodelci, omogočijo, da se KMC zadržijo v magnetnem polju, med tem ko vse druge celice, ki nimajo vezanih protiteles, potujejo skozi kolono in tvorijo »negativno« frakcijo pripravka. Po odstranitvi kolone iz magneta zberemo populacijo KMC (»pozitivna« frakcija) in jo s centrifugiranjem zmanjšamo na ustrezni volumen. Število in viabilnost celic CD34+ v nastalem pripravku (uporabijo se lahko tudi druga protitelesa za ločevanje KMC) preverimo s pretočnim citometrom. Izračunamo tudi izkoristek postopka in čistost pripravka po naslednjih dveh obrazcih: 1. izkoristek postop-

ka je število celic CD34+ v »pozitivni« frakciji glede na število celic CD34+ v začetnem levkocitnem pripravku, 2. čistost pripravka je število celic CD34+ v »pozitivni« frakciji glede na število levkocitov v »pozitivni« frakciji.

V našem laboratoriju uporabljamo tehnologijo CliniMACS plus (Miltenyi Biotec) za pripravo koncentriranih celic CD34+. S tem postopkom skoncentriramo v povprečju 60 % (19–99 %) s citaferezo zbranih celic CD34+, vendar se izkoristki postopka med bolniki razlikujejo, verjetno zaradi različnih krvnih slik. Vseh dejavnikov, ki vplivajo na učinkovitost zbiranja, še ne poznamo. S slabšo učinkovitostjo zbiranja povezujejo večjo koncentracijo granulocitov in trombocitov v začetnem pripravku. Z ločevanjem in koncentriranjem matičnih celic pripravimo čistejšje pripravke, hkrati pa tudi izgubimo del matičnih celic v negativni frakciji, zato moramo ob

načrtovanem zbiranju celic za klinično uporabo upoštevati to izgubo. Povprečna čistost pripravka je 80 %, povprečna živost celic pa je 98 %. V pripravku je lahko od $11-400 \times 10^6$ celic CD34+, odvisno od števila v začetnem pripravku (8).

10. Zaključek

Kakovost pripravkov KMC spremljamo z različnimi testi. Nekateri se uporabljajo rutinsko za vse pripravke (koncentracija KMC, viabilnost), drugi le za določene pripravke (CFU test za popkovnično kri). Apoptotičnost celic se običajno preverja pri odmrznjenih pripravkih. Koncentracijo KMC določamo s pretočno citometrijo na podlagi označevalca CD34. Uporaba dodatnih celičnih označevalcev bi omogočila ločevanje med različnimi subpopulacijami KMC, s čimer bi lahko bolje napovedali učinkovitost in dinamiko »prijetja« presadka.

Literatura

1. Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje. Uradni list RS 2007;17(61):8529–8536; in 2015;25(56):6539–6548.
2. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844–53.
3. Weissman IL. Stem Cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157–68.
4. Payne KJ, Crooks GM. Human hematopoietic lineage commitment. *Immunological Reviews*. 2002;187(1):48–64.
5. Wood B. Multicolor Immunophenotyping: Human Immune System Hematopoiesis. *Methods in Cell Biology*: Elsevier; 2004. p. 559–76.
6. Glossmann JP, Josting A, Pfistner B, Paulus U, Engert A. A randomized trial of chemotherapy with carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (BEAM) plus peripheral stem cell transplantation (PBSCT) vs single-agent high-dose chemotherapy followed by BEAM plus PBSCT in patients with relapsed Hodgkin's disease (HD-R2). *Annals of Hematology*. 2002;81(8):424–9.
7. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87(1):1–13.
8. Kresnik PK, Krasna M, Rozman P, Vrtovec B, Malicev E. Collection and immunoselection of CD34+ cells: the impact of age, sex, and diabetes in patients with chronic heart failure. *Transfusion*. 2016;56(7):1792–800.
9. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee IAN. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*. 1996;5(3):213–26.
10. Jansen EM, Hanks SG, Terry C, Akard LP, Thompson JM, Dugan MJ, et al. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit?granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion*. 2007;47(5):817–23.
11. Laura E Sidney, Matthew J Branch, Siobhán E Dunphy, Harminder S Dua, and Andrew Hopkinson Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380–89.
12. Krašna M, Maličev E, Jež M, Nunar Perko A, Cukjati M. Kakovost odmrznjenih pripravkov krvotvornih matičnih celic za presaditev. *Slovenian Medical Journal*. 2015;84(6).
13. Ivanovic Z, Vlaski M. Production of hematopoietic cells from umbilical cord blood stem cells for transfusion purposes: focus on ex vivo generation of red blood cells. *Scr Med*. 2012;43(2):99–105

14. Verfaillie CM, Almeida-Porada G, Wissink S, Zanjani ED. Kinetics of engraftment of CD34⁻ and CD34⁺ cells from mobilized blood differs from that of CD34⁻ and CD34⁺ cells from bone marrow. *Experimental Hematology*. 2000;28(9):1071–9.
15. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol*. 1998;26(4):353–60.
16. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34⁻Lin⁻ and CD34⁺Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000;95(5):2813–20.
17. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *The Journal of Pathology*. 2007;214(1):3–9.
18. Stewart AK, Imrie K, Keating A, Anania S, Nayar R, Sutherland DR. Optimizing the CD34⁺ and CD34⁺Thy-1⁺ stem cell content of peripheral blood collections. *Exp Hematol*. 1995;23(14):1619–27.
19. Donnenberg AD, Koch EK, Griffin DL, Stanczak HM, Kiss JE, Carlos TM, et al. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. *Cytotherapy*. 2002;4(2):157–63.
20. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. Supplementation of Conventional Freezing Medium with a Combination of Catalase and Trehalose Results in Better Protection of Surface Molecules and Functionality of Hematopoietic Cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2003;12(5):553–64.
21. Fisher V, Khuu H, David-Ocampo V, Byrne K, Pavletic S, Bishop M, et al. Analysis of the recovery of cryopreserved and thawed CD34⁺ and CD3⁺ cells collected for hematopoietic transplantation. *Transfusion*. 2013;54(4):1088–92.
22. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood*. 1991;77(6):1218–27.
23. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(10):5320–5.
24. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112(9):3543–53.
25. Dooley DC. Analysis of Primitive CD34⁻ and CD34⁺ Hematopoietic Cells from Adults: Gain and Loss of CD34 Antigen by Undifferentiated Cells Are Closely Linked to Proliferative Status in Culture. *Stem Cells*. 2004;22(4):556–69.
26. McKenzie JL, Takenaka K, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin⁻CD34⁺CD38⁻ population. *Blood*. 2007;109(2):543–5.
27. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218–21.
28. Gunji Y, Nakamura M, Osawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Miura Y, Yanagisawa M, Suda T. Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KIT^{low} cells than in KIT^{high} cells. *Blood*. 1993;82(11):3283–89.
29. Liu H, Verfaillie CM. Myeloid-lymphoid initiating cells (ML-IC) are highly enriched in the rhodamine-c-kit⁺CD33⁻CD38⁻ fraction of umbilical cord CD34⁺ cells. *Experimental Hematology*. 2002;30(6):582–9.
30. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002–12.
31. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, et al. CD133 is a positive marker for a distinct class of primitive human cord blood-derived CD34⁻negative hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2013;28(6):1308–15.
32. Radtke S, Görgens A, Kordelas L, Schmidt M, Kimmig KR, Köninger A, et al. CD133 allows elaborated discrimination and quantification of haematopoietic progenitor subsets in human haematopoietic stem cell transplants. *British Journal of Haematology*. 2015;169(6):868–78.
33. 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 Transplantation*. 2003;32(10):1021–6.
34. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*. 2000;40(6):693–6.
35. Xiao M, Dooley DC. Assessment of Cell Viability and Apoptosis in Human Umbilical Cord Blood Following Storage. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2003;12(1):115–22.
36. Sparrow RL, Komodromou H, Tippett E, Georgakopoulos T, Xu W. Apoptotic lymphocytes and CD34⁺ cells in cryopreserved cord blood detected by the fluorescent vital dye SYTO 16 and correlation with loss of L-selectin (CD62L) expression. *Bone Marrow Transplantation*. 2006;38(1):61–7.
37. López MC, Lawrence DA. Proficiency testing experience for viable CD34⁺ stem cell analysis. *Transfusion*. 2008;48(6):1115–21.
38. Anthony RS, McKelvie ND, Cunningham AJ, Craig JIO, Rogers SY, Parker AC. Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*. 1998;21(5):441–6.
39. Radke TF, Barbosa D, Duggleby RC, Saccardi R, Querol S, Kögler G. The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Appliance of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays. *Stem Cells International*. 2013;2013:1–10.

40. Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Jovčić G, Stojanović N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplantation*. 1999;23(6):613–9.
41. Matsumoto N, Yoshizawa H, Kagamu H, Abe T, Fujita N, Watanabe S, et al. Successful liquid storage of peripheral blood stem cells at subzero non-freezing temperature. *Bone Marrow Transplantation*. 2002;30(11):777–84.
42. Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. Cryopreservation of Stem Cells Using Trehalose: Evaluation of the Method Using a Human Hematopoietic Cell Line. *Stem Cells and Development*. 2004;13(3):295–305.
43. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2003;3(7):526–32.
44. Ito CY, Kirouac DC, Madlambayan GJ, Yu M, Rogers I, Zandstra PW. The AC133+CD38-, but not the rhodamine-low, phenotype tracks LTC-IC and SRC function in human cord blood ex vivo expansion cultures. *Blood*. 2010;115(2):257–60.
45. Valeri CR, Pivacek LE. Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on *in vitro* measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion*. 1996;36(4):303–8.
46. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, Rapatel C, Berger M, Travade P, Angielski S, Bonhomme J, Deméocq F. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80°C , with only 3.5 % DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion*. 2001;41(5):667–73.
47. Zver S, Melkić E, Radevska T. Zdravljenje diseminiranega plazmocitoma na Kliničnem oddelku za hematologijo UKC Ljubljana z avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic v letih 2014 in 2015. *Zdrav Vestn*. 2016;85(9).
48. Pretnar J, Tonejc M, Cotič-Flajs C, Preložnik-Zupan I. Nesorodna alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic pri zdravljenju odraslih bolnikov z akutnimi levkemijami in kronično mieloično levkemijo – 6-letne izkušnje. *Zdrav Vestn* 2008;77 Supl: I-47–50.
49. Novakovic BJ. Immunotoxin – a new treatment option in patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Radiology and Oncology*. 2015;49(4):315–19.
50. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(2):645–50.
51. FACT-JACIE International Standards for Hematopoietic Cellular Therapy Product Collection, processing, and Administration. 6th ed. Nebraska: Fact; 2015.