Uloga medicinsko laboratorijske dijagnostike u pripremi pripravaka krvotvornih matičnih stanica

Marinčić, Jozefina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:347238

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Jozefina Marinčić

ULOGA MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE U PRIPREMI PRIPRAVAKA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

Završni rad

Split, 2015.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Jozefina Marinčić

ULOGA MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE U PRIPREMI PRIPRAVAKA KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

THE ROLE OF MEDICIN LABORATORY DIAGNOSTICS IN THE PREPARATION OF HAEMATOPOIETIC STEM CELL PRODUCT

Završni rad / *Bachelor thesis*

Mentor:

mag. med. lab. dijagn. Mirela Ančić

Split, 2015.

Ovaj završni rad je izrađen na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija - Sveučilište u Splitu pod stručnim vodstvom mentorice *mag. med. lab. dijagn. Mirele Ančić* u vremenskom razdoblju od ožujka do srpnja 2015. godine.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Krvotvorni organski sustav.....1

1.2. Krvotvorne matične stanice.....2

1.2.1. Izvori krvotvornih matičnih stanica.....3

1.3. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica u perifernu krv.....3

2. CILJ.....5

3. IZVORI PODATAKA I METODE.....6

3.1. Povijest transplantacije hematopoeznih matičnih stanica.....6

3.2. Transplantacija hematopoeznih matičnih stanica danas.....7

3.3. Vrste transplantacije.....7

3.3.1. Transplantacija alogenih hematopoeznih matičnih stanica.....7

3.3.2. Transplantacija autolognih hematopoeznih matičnih stanica.....9

3.3.3. Transplantacija hematopoeznih matičnih stanica iz krvi pupkovine.....11

3.4. Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica.....13

3.4.1. Priprema pacijenta prije sakupljanja.....13

3.4.2. Postupak sakupljanja krvotvornih matičnih stanica.....14

3.4.2.1. Vrste staničnih separatora.....15

3.4.2.2. Venski pristup.....20

3.4.2.3. Sprječavanje zgrušavanja.....21

3.4.2.4. Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica u djece.....22

3.5. Obrada pripravaka krvotvornih matičnih stanica.....23

3.5.1. Kontrola kvalitete pripravaka krvotvornih matičnih stanica.....25

3.5.1.1. Broj i vrsta stanica.....26

3.5.1.2. Imunofenotipizacija krvotvornih matičnih stanica.....27

3.5.1.3. Vijabilnost stanica.....29

3.5.1.4. Kratkotrajna kultura krvotvornih matičnih stanica.....29

3.5.1.5. Mikrobiološko testiranje.....30
3.5.1.6. Analiza kontaminacije tumorskim stanicama.....31
3.6. Zamrzavanje pripravaka krvotvornih matičnih stanica.....32
3.6.1. Dugotrajna pohrana.....33
3.7. Dobra prerađivačka praksa i akreditacija.....35
4. REZULTATI.....36
4.1. Klinički rezultati autologne transplantacije.....36
4.2. Neželjene reakcije povezane s prikupljanjem i transplantacijom krvotvornih matičnih stanica.....37
5. ZAKLJUČCI.....43
6. LITERATURA.....44
7. SAŽETAK.....46
8. SUMMARY.....48
9. ŽIVOTOPIS.....50

1. UVOD

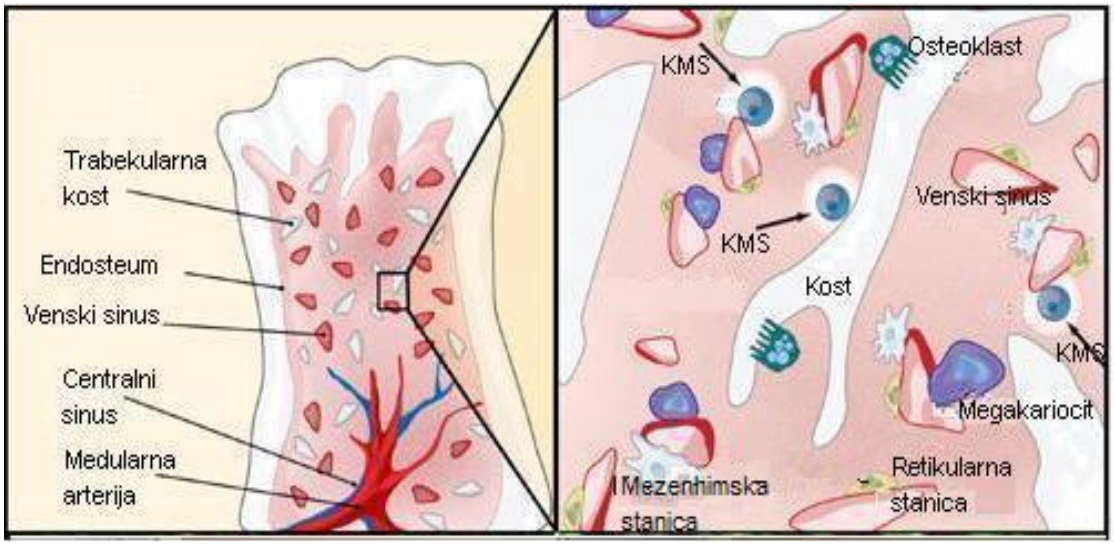
1.1. Krvotvorni organski sustav

Krvotvorni sustav, kojeg čine koštana srž, timus, slezena i limfni čvorovi, je jedinstven organski sustav jer organi i tkiva koji ga izgrađuju nemaju anatomsku cjelinu, no krvlju su povezani u različitim funkcionalnim aktivnostima.

U koštanoj srži se odvija proces hematopoeze odnosno proces nastanka zrelih stanica svih krvnih loza proliferacijom i diferencijacijom krvotvornih matičnih stanica (KMS) *(engl. haematopoietic stem cells, HSC)*. Kako zrele krvne stanice imaju ograničen vijek trajanja prisutna je trajna potreba za njihovim obnavljanjem, a tome u prilog govori podatak da se u čovjeka svaki dan mora nadomjestiti $2x10^{11}$ eritrocita i 10^{10} leukocita. Osim toga, krvotvorne matične stanice moraju osigurati i svoj opstanak određenim brojem dioba bez diferencijacije, a to im omogućuje njihovo najvažnije svojstvo – samoobnavljanje. Usmjerenje loze i diferencijacija KMS i njezinih potomaka ovise o unutarnjim svojstvima stanica i vanjskim činiteljima iz specijaliziranog mikrookoliša. Balans između samoobnavljanja i diferencijacije KMS je dinamičan proces koji se odvija ovisno o fiziološkim potrebama organizma. [1]

Primarno, KMS odraslog čovjeka se nalaze u koštanoj srži. Koštana srž (medulla, osium ili koštana moždina) je smještena u moždinskim šupljinama kosti i u prostorima među gredicama spužvastog koštanog tkiva. [2] Sastavljena je od krvotvornih stanica, strome i venskih sinusa koji ispunjavaju koštane šupljine ispresijecane koštanim lamelama. [3] Dvije su vrste koštane srži – crvena i žuta. U crvenoj koštanoj srži se stvaraju crvene i bijele krvne stanice, te krvne pločice i ona se nalazi u plosnatim kostima poput prsne kosti, kralješcima, rebrima, ključnoj kosti, kosti zdjelice i svoda lubanje. U žutoj se stvaraju samo neke bijele krvne stanice. Karakteristična žuta boja je rezultat velikog broja masnih stanica, a nalazi se u dugim, cjevastim kostima. [2]

Struktura koštane srži prikazana je na sljedećoj slici:



Slika 1. Shematski prikaz koštane srži[3]

Hematopoeza se odvija u ekstravaskularnim prostorima, a zrele krvne stanice ulaze u cirkulaciju preko venskih sinusa kroz prolaze koje nastaju u endotelu ili kroz endotelne citoplazmatske pore. [3]

1.2. Krvotvorne matične stanice

Krvotvorne matične stanice se opisuju kao populacija nediferenciranih stanica koje imaju sposobnost samoobnavljaja, neograničenog dijeljenja i diferencijacije u prastanice visoko specijaliziranih stanica. Samoobnavljanje, kao jedno od najbitnijih svojstava KMS, je sposobnost matične stanice da se podijeli na takav način da obje ili jedna stanica kćeri zadrži sve osobine stanice majke. [2]

Krvotvorna matična stanica, koja nosi biljeg CD34+, je zajednička stanica koja se diferencira u prastanice mijelopoeznog i limfopoeznog reda iz kojih procesima proliferacije i sazrijevanja (maturacije) nastaju sve funkcionalno zrele krvne stanice. U koštanoj srži matične stanice čine samo 0.003% stanica, a samo 2% ovih stanica se u jednom trenutku aktivno dijele. [4] Od kad su Till i McCulloch početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća prvi puta otkrili KMS u koštanoj srži miša, razvijene su brojne metode koje su omogućile upoznavanje mnogih osobina ovih stanica. Danas je poznato

da održavanje KMS i reguliranje njihovog samoobnavljanja i diferencijacije *in vivo* ovisi o njihovom specifičnom mikrookolišu koji se naziva hematopoetski induktivni mikrookoliš ili niša matičnih stanica. Sedamdesetih godina Schofield je prvi put uveo pojam „niša KMS“ za specifičan mikrookoliš KMS u koštanoj srži. Međutim, tek nedavno je taj pojam podržan i rezultatima istraživanja vrste stanica i molekula koje je oblikuju. Saznalo se za mnoge različite vrste signala koje se izmjenjuju između matičnih stanica i stanica niše, kao i signalni putovi koji nadziru održavanje, samoobnavljanje i diferencijaciju matičnih stanica. Budući da se tkivne matične stanice odraslog organizma kao i KMS rijetko dijele, one mogu biti u stanju mirovanja tjednima ili čak mjesecima, te se smatraju metabolički inaktivnima, a služe kao pričuva stanica koje se reaktiviraju kao odgovor na stres ili oštećenje. Stoga niša mora pružiti i uvjete u kojima će KMS biti u stanju mirovanja dok se ne pokaže potreba za samoobnavljanjem, diferencijacijom i proliferacijom. Prostor niše može biti prazan tj. bez matične stanice, a potom može prihvatiti i održati novopridošle transplantirane matične stanice. Bitno je naglasiti da je tek primjena molekula na površini stanice iz obitelji SLAM *(engl. signaling lymphocte activation molecule)* olakšala identifikaciju krvotvornih matičnih stanica imunoflorescencijom u tkivnim presjecima. Bojanje presjeka kroz hematopoetsko tkivo koštane srži s ovim markerima otkriva prisustvo KMS u blizini endosteuma (endostalna niša) i oko venskih sinusa (vaskularna niša). [2]

1.2.1. Izvori krvotvornih matičnih stanica

Za liječenje bolesnika KMS se prikupljaju iz koštane srži, periferne krvi i krvi iz pupkovine, a mogu se uzeti od bolesnika (autologne KMS) ili od druge osobe (alogenične KMS, srodne i nesrodne). [5] Više o ovome će biti govora u razradbenom dijelu završnoga rada.

1.3. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica u perifernu krv

Mobilizacija KMS označava poticanje izlaska KMS iz koštane srži u cirkulaciju i događa se kao odgovor na stres ili oštećenje stanica koštane srži. Brz, ali prolazan porast broja KMS u krvi zabilježen je nakon fizičke aktivnosti, stresa izazvanog

primjenom adrenokortikotropnog hormona, primjene endotoksina, sintetičkog polianiona dekstran sulfata i protutijela protiv adhezijske molekule VLA-4 (anti-VLA4, anti-CD49d). U uvjetima homeostaze u cirkulaciji se nalazi tek mali broj KMS tako da se procjenjuje da periferna krv sadrži manje od 0,05% CD34+ stanica. Kao problem pri korištenju krvi kao izvora KMS istaknuo se veliki broj postupaka leukafereze potrebnih za sakupljanje dovoljnog broja stanica. Zbog toga se, u svrhu smanjenja broja leukafereza, počelo razmišljati kako u cirkulaciji povećati broj krvotvornih prastanica i stanica-preteča. Za potrebe transplantacije KMS se mogu mobilizirati u perifernu krvi na više načina: mijelosupresivnom kemoterapijom, krvotvornim činiteljima rasta, interleukinom-7 (IL-7), IL-3, IL-12, SCF i Flt3 ligandom ili njihovom kombinacijom, te novim agensima kao što su AMD3100 i pegilirani krvotvorni činitelji rasta. [1]

Nakon uvodnog pregleda definicije i karakteristika krvotvornog organskog sustava koji je odgovoran za proizvodnju KMS dalje se u ovom završnom radu nameće tema iskoristivosti istih u medicinske svrhe. Naime, kao mogućnost liječenja danas se sve više koristi transplantacija krvotvornih matičnih stanica. U nastojanju ostvarivanja uspješne transplantacije i najveće moguće dobrobiti za pacijenta neizostavno mjesto zauzima medicinsko laboratorijska dijagnostika. Njezina uloga u ovom dijelu medicine tj. u procesu od indikacije, pa sve do provjere učinkovitosti transplantacije bit će opisana na sljedećim stranicama.

2. CILJ

Da bi transplantacija bila uspješna nužno je da se s pripravcima krvotvornih matičnih stanica postupa prema standardiziranim normama. Te protokole prati i medicinsko laboratorijska dijagnostika čije je glavno zaduženje kvalitetno pripremiti pripravake krvotvornih matičnih stanica. Dakle, cilj ovoga rada je prikazati i objasniti zadaće neizostavne komponente u autolognoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica, a to je laboratorij.

3. IZVORI PODATAKA I METODE

Ovaj završni rad je pregledni rad koji je napisan na temelju različitih izvora literature. Kao izvori podataka korištene su medicinske knjige, znanstveni pregledni članci, članaci temeljeni na provedenim istraživanjima te zakonski propisane norme vezane za laboratorijski dio u autolognoj transplantaciji krvotvornih matičnih stanica.

3.1. Povijest transplantacije hematopoeznih matičnih stanica

Kao mogućnost liječenja transplantacija hematopoeznih matičnih stanica poznata je već 50-ak godina. Ovakva metoda liječenja omogućuje da se manje vrijedne krvotvorne stanice zamjenjuju zdravima. [6] Krvotvorne matične stanice su 1962. godine otkrivene u perifernoj krvi miša, a 1971. godine i u ljudi. U perifernoj krvi KMS se nalaze u značajno manjem broju nego u koštanoj srži, a razvojem aparata za aferezu, tzv. staničnih separatora omogućilo se prikupljanje velikog broja KMS iz periferne krvi. Naime, istraživanja na laboratorijskim životinjama provedena četrdesetih i pedesetih godina dvadesetog stoljeća omogućila su razvoj transplantacije krvotvornih matičnih stanica (KMS) u ljudi. Prvu uspješnu transplantaciju koštane srži učinio je 1956.godine Donnall Thomas, a tijekom sljedeća dva desetljeća postupno se razvila u standardnu metodu liječenja. Prva transplantacija alogenih KMS prikupljenih s 10 postupaka leukafereze iz periferne krvi nestimuliranog darivatelja učinjena je 1989. godine. Nakon što je uočeno da se primjenom činitelja rasta može povećati broj krvotvornih prastanica u perifernoj krvi, 1993. godine učinjena je prva uspješna transplantacija alogenih KMS prikupljenih iz periferne krvi nakon mobilizacije krvotvornim činiteljem rasta (*engl. granulocyte colony stimulating factor; G-CSF*). S druge strane, već potkraj pedesetih godina 20. stoljeća učinjene su prve transplantacije autologne koštane srži. Međutim, transplantacije autolognih KMS u prošlosti su uglavnom bile neuspješne zbog nerazvijene tehnike zamrzavanja stanica i nedovoljnog poznavanja principa visokodozne kemoterapije. Tek sredinom sedamdesetih godina učinjene su prve uspješne transplantacije s krioprezerviranom koštanom srži. Od tada ova metoda bilježi stalan i eksplozivan napredak. [10]

3.2. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica danas

Danas je transplantacija KMS široko prihvaćena metoda liječenja raznih vrsta kongenitalnih i stečenih malignih bolesti krvotvornog i imunološkog sustava, kao i nekih solidnih tumora. [7] Za potrebe transplantacije rabe se tri izvora KMS, a to su koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Odluka o odabiru izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti davatelja KMS. Iako se funkcija koštane srži može obnoviti nakon transplantacije KMS iz sva tri izvora, poznato je da postoje brojne kvantitativne i kvalitativne razlike između transplantata prikupljenih iz različitih izvora KMS. Tradicionalni izvor KMS je koštana srž koja danas sve više ustupa mjesto transplantatu prikupljenom iz periferne krvi. [8]

3.3. Vrste transplantacije hematopoeznih matičnih stanica

Postoje tri vrste transplantacije krvotvornih matičnih stanica, a to su :

- Alogena transplantacija KMS
- Autologna transplantacija KMS
- Transplantacija KMS iz krvi pupkovine

3.3.1. Transplantacija alogenih hematopoeznih matičnih stanica

Matične hematopoezne stanice iz koštane srži ili iz periferne krvi za alogeničnu transplantaciju uzimaju se od zdravog HLA (**H**umani **L**eukocitni **A**ntigen) podudarnog davatelja. [6] Kako samo mali broj bolesnika, kojima je potrebno liječenje transplantacijom KMS, ima srodnog HLA identičnog darivatelja u 80-im godinama prošlog stoljeća osnovani su registri dobrovoljnih darivatelja koštane srži. Iako je broj registriranih darivatelja velik, samo za 30% bolesnika moguće je pronaći HLA identičnog darivatelja. [5]

Alogenična transplantacija je standardna metoda liječenja mnogih zloćudnih tumora i nekih prirođenih i stečenih bolesti koštane srži. U bolesnika sa zloćudnim tumorima krvotvornog sustava alogenična transplantacija je postremisijska metoda

liječenja koja pruža bolesnicima najbolje izglede za izlječenje i preživljavanje. Na žalost, samo jedna trećina bolesnika u kojih je indicirano liječenje alogeničnom transplantacijom ima HLA podudarnog darivatelja unutar obitelji. Transplantacija matičnih krvotvornih stanica od HLA podudarnog nesrodnog darivatelja omogućila je primjenu transplantacije znatno većem broju bolesnika. Idealan nesrodni darivatelj je podudarnosti 10/10 testiranih HLA lokusa. U bolesnika čija je bolest visokog rizika, dobar terapijski odgovor postiže se i transplantacijom matičnih stanica od darivatelja koji se od bolesnika razlikuje u jednom ili dva lokusa HLA sustava (9/10 ili 8/10), jer tada rizik same bolesti nadvlada rizik učinka HLA nepodudarnosti na preživljavanje.

Učinak na bolest postiže se primjenom intenzivne citostatske terapije u kombinaciji s ozračenjem cijelog tijela ili bez njega. [9] Cilj takve pripreme za transplantaciju je suprimirati imunosni sustav primatelja da ne odbaci presađene stanice i u bolesnika sa zloćudnim tumorom eradicirati zloćudni tumorski klon. [6] Važan mehanizam učinka alogenične transplantacije na bolest je imunološke prirode u kojem imunokompetentne stanice iz transplantata prepoznaju antigene stanice zloćudnog tumora. To je zapravo učinak presatka protiv tumora (*engl. GvLR Graft versus Leukemia Reactiont*). Djelotvorni učinak transplantacije na bolest značajno je kompromitiran neželjenim toksičnim učinkom, ponajprije reakcijom presatka protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease;* GvHD). Uz relaps/progresiju zloćudnih tumora i teške infekcije, GvHD je glavni uzrok smrti bolesnika, a njegov kronični oblik značajno narušava kvalitetu života [9]

Tablica 3.1.1. Ciljni organi koji mogu biti oštećeni primjenom velikih doza citostatika i ozračenja u pripremi za transplantaciju [6]

Lijekovi/ postupci u pripremi za transplantaciju	Zahvaćeni organi
ozračenje	pluća, srce
ciklofosfamid	srce
busulfan	pluća
etopozid	jetra
karmustin	pluća
citarabin	SŽS, živčano tkivo
melfalan	pluća, probavni sustav

3.3.2. Transplantacija autolognih matičnih hematopoeznih stanica

Transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica (ATKS) koštane srži ili periferne krvi, metoda je liječenja zloćudnih bolesti pri kojoj se za za eradikaciju bolesti rabe ekstremno visoke doze kemoterapije i/ili zračenja, a pri tome nastalo ireverzibilno oštećenje koštane srži prevladava se infuzijom prethodno izvađenih i zamrzavanjem sačuvanih matičnih stanica. Ova metoda se temelji na znanju o odnosu doze i učinka citostatskih lijekova. Mnogostruko povećanje doze citostatika može eradicirati zloćudnu bolest koja je inače rezistentna i neizlječiva uz konvencionalne doze lijekova. Međutim, povećanje doza citostatske terapije je najviše ograničeno hematopoeznom toksičnošću jer je krvotvorno tkivo najosjetljivije na citotoksične tvari. Prethodnim uzimanjem KMS-a, te njihovom infuzijom, nakon intenzivne terapije, prevladava se toksičnost kemoradioterapije za krvotvorni sustav. Uz navedeno nužne su i adekvatne potporne mjere liječenja npr. dobra transfuzijska terapija, prevencija i liječenje ozbiljnih infekcija antibioticima i antifungicima, primjena faktora rasta i dr. kako bi se premostilo vrijeme aplazije koštane srži od transplantacije do oporavka hematopoeze. Indikacije za autotransplantaciju danas su uglavnom maligni ne-Hodgkinov limfom, Hodgkinove

bolesti, akutne leukemije, te multipli mijelom, međutim, u posljednje vrijeme bilježi se eksponencijalno povećanje broja bolesnika liječenih ATKS-om. Naime, razlog tome je širenje indikacija za transplantaciju s prethodno striktno hematoloških bolesti na solidne tumore, a čak je u novije vrijeme stvorena i koncepcija liječenja autoimunih bolesti transplantacijom koštane srži. [6]

Od prve autologne transplantacije, pa do današnjih dana snažno je napredovala tehnologija prikupljanja, krioprezervacije i separacije stanica. Autologne matične krvotvorne stanice u početku su prikupljane aspiracijom koštane srži iz velikih kostiju zdjelice, a ponekad i iz prsne kosti dok je bolesnik bio u općoj anesteziji u operacijskoj sali. Saznanja da matične stanice cirkuliraju u krvi te da se kombiniranom primjenom citostatika i činitelja rasta mogu mobilizirati iz koštane srži u krv te prikupiti postupkom leukafereze omogućila su njihovu kliničku primjenu. [10] Danas postupak ATKS prolazi kroz 4 osnovne faze: 1. sakupljanje matičnih stanica od bolesnika, njihova obrada, eventualno „čišćenje“ od rezidualnih malignih stanica i zamrzavanje, 2. primjena visokih, mijeloablativnih doza kemoterapije i zračenja, 3. odmrzavanje matičnih stanica i infuzija stanica u bolesnika, 4. potporna terapija nakon transplantacije do oporavka hematopoeze i imunopoeze – profilaksa i liječenje infekcija, nadoknada krvnih stanica transfuzijama. Također, u dijela bolesnika se u ovoj fazi primjenjuje dodatna konsolidacijska terapija za eradikaciju eventualno preostalih tumorskih stanica. [6]

Autotransplantacija ima prednost u odnosu na alogenu transplantaciju jer ne zahtijeva postojanje HLA podudarnog srodnog davatelja matičnih hematopoeznih stanica, a može se primijeniti i u liječenju starijih osoba sve do 65 godina života. Nadalje, toksičnost liječenja ATKS-om je bitno manja jer nema moguće reakcije transplantata protiv primatelja (GvHD) koja je glavni uzrok smrtnosti nakon alogene transplantacije. S druge strane, nedostatak joj je što nema važnog imunosnog učinka tuđih stanica protiv tumora (GvLR), a postoji i mogućnost prisutnosti tumorskih stanica u samom transplantatu. Zbog navedenog učestalost relapsa bolesti je bitno veća nego nakon alogene transplantacije. Međutim, unatoč navedenim nedostatcima ATKS svojom manjom toksičnošću donekle nadoknađuje slabiji rezultat zbog veće incidencije relapsa. [6]

3.3.3. Transplantacija hematopoeznih matičnih stanica iz krvi pupkovine

Prikupljanje koštane srži i krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi, za razliku od prikupljanja krvi iz pupkovine, postupci su koji imaju određeni rizik za zdrave davatelje. Nakon djetetova poroda u krvnim žilama posteljice i pupkovine preostaje krv koja sadrži velik broj krvotvornih matičnih stanica sličnih stanicama iz koštane srži. Iz tih se stanica mogu razviti sve vrste krvnih stanica (eritrociti, leukociti, trombociti). Budući da mogu obnoviti koštanu srž, te se stanice mogu transplantirati umjesto stanica koštane srži u liječenju hematoloških bolesti i teških poremećaja imunosnog sustava, te poremećaja metabolizma i sinteze hemoglobina. S obzirom na biološke mogućnosti krvi koja u posteljici ostaje, prije nego se uništi, krv iz posteljice počela se unatrag desetak godina prikupljati i dugotrajno pohranjivati na vrlo niskim temperaturama. [11]

Bitno je dodati da se matične stanice iz pupkovine razlikuju od ostalih matičnih stanica. Naime, matične stanice iz pupkovine su najmlađe stanice. Druge po redu stanice su embrionalne stanice koje se, zbog etičkih prijepora, više ne primjenjuju u liječenju. Treća i najstarija skupina su odrasle matične stanice koje se nalaze u djece i odraslih. One su već usmjerene prema određenom tkivu, na primjer matične stanice koštane srži i periferne krvi. Najbitnija razlika je ta da te stanice nemaju takvu proliferativnu sposobnost kao stanice pupkovine ili embrionalne stanice.

Krv iz pupkovine prikuplja se odmah nakon rođenja djeteta i njegovog odvajanja od posteljice. Još dok se posteljica nalazi u maternici pupkovina se dezinficira nakon čega se ubode pupčana vena iglom spojenom s vrećicom koja omogućuje prikupljanje što veće količine zaostale krvi u posteljici. U većini slučajeva vrijeme prikupljanja krvi iz pupkovine traje oko 5 minuta, jer nakon toga dolazi do početka normalnih procesa zgrušavanja u pupčanoj vrpci i placenti. Bitno je naglasiti i to da se radi prikupljanja krvi iz pupkovine uobičajeni tijek poroda ne smije mijenjati jer je sigurnost majke i djeteta na prvom mjestu. Postupak prikupljanja krvi je bezbolan i nije opasan ni za majku ni za dijete. Prikupljena krv iz pupkovine mora biti obrađena i pohranjena unutar 48 sati od poroda. Odmah nakon prikupljanja, krv se dostavlja u banku u kontroliranim uvjetima. Automatskom obradom prikupljene krvi uklanjaju se eritrociti i plazma, a

izdvaja sloj leukocita u kojem se nalaze matične stanice. Taj sloj stanica koristi se za transplantaciju. Stanicama se dodaje krioprotektivna otopina koja omogućuje zamrzavanje na vrlo niskim temperaturama. Zamrznute stanice se čuvaju u spremnicima s tekućim dušikom na -196°C. Nažalost, prikupljanje krvi iz pupkovine nije uvijek uspješno. Ponekad je volumen krvi iz pupkovine nedostatan ili se krv može zgrušati tijekom postupka prikupljanja. Količina je posebno važna kad je u pitanju krv iz pupkovine. Naime, broj matičnih stanica proporcionalan je volumenu krvi iz pupkovine. U najvećem broju slučajeva broj matičnih stanica u korelaciji je s pohranjenim volumenom. Dakle, što je veći volumen, više je stanica. To je posebno značajno u slučaju kada se umbilikalna krv donira u javnu banku koja pohranjuje transplantate za liječenje odraslih bolesnika. U slučaju kada se krv iz pupkovine pohranjuje za vlastite potrebe, volumen je važan, ali nije presudan za pohranu, jer se ne zna hoće li krv iz pupkovine biti korištena za liječenje djeteta ili odrasle osobe ili će biti upotrebljena za obnovu oštećenog tkiva za što će trebati manji broj stanica.

Što se tiče darivatelja, većina žena može darovati krvi iz pupkovine. Međutim mora se biti sigurno da je darovana krv iz pupkovine sigurna za primatelja. Stoga svaka darivateljica krvi iz pupkovine ispunjava zdravstveni upitnik. Nažalost, ne može se darovati krv u slučaju blizanačke ili druge višeplodne trudnoće. Kod višeplodnih trudnoća, budući da je manja posteljica nego kod jednoplodne trudnoće, nakon poroda se ne može prikupiti dovoljno krvi iz pupkovine za javnu banku.

Osnivanje banaka umbilikalne krvi znak je tehnološkog i zdravstvenog napretka, a početak rada takve banke svrstava Hrvatsku uz sam bok zemalja u kojima takvi programi već dugi niz godina žive. Razlog osnivanja tih banaka leži u tome da se krv iz pupkovine može koristiti za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica na isti način i za iste bolesnike kao i koštana srž ili KMS iz periferne krvi. Postoje javne i obiteljske banke. Javne banke su neprofitne ustanove i pohranjuju krv iz pupkovine za opću dobrobit. One su povezane u međunarodnu mrežu, pa pohranjeni transplantati mogu biti korišteni za liječenje bolesnika širom svijeta. S druge strane, u obiteljskim bankama pohranjuje se krv iz pupkovine za osobne potrebe kako bi u slučaju potrebe bile iskorištene u liječenju članova obitelji. Može se reći da je ta krv svojevrsno biološko osiguranje. S obzirom da nije točno poznata svrha za koju će stanice u budućnosti biti korištene, ne postoje jasno definirani zahtjevi kvalitete koje autologna krv iz pupkovine

pohranjena u privatnu banku mora zadovoljiti. Stoga se u obiteljsku privatnu banku pohranjuje sva prikupljena krv iz pupkovine koju je moguće adekvatno obraditi. Još uvijek se vode dileme oko toga koliki je vijek zamrznutih stanica iz pupkovine.

Na razini Hrvatske, osim u zagrebačkim bolnicama, krv za pohranjivanje u javnoj banci prikuplja se i drugim gradovima diljem Hrvatske kao što su Split, Zadar, Osijek, Rijeka, Dubrovnik, Karlovac, Čakovec, Virovitica, Vinkovci, Pula, Koprivnica, Varaždin, Sisak, Slavonski Brod i Zabok koja se transportira do Zagreba. [12]

3.4. Sakupljanja krvotvornih matičnih stanica

Već je spomenuto da periferna krv kao izvor KMS-a ima neke prednosti u odnosu na koštanu srž. Naime, nakon primjene citostatika i krvotvornih faktora rasta (G-CSF) mobilizirane matične stanice periferne krvi imaju značajnu prednost u odnosu na koštanu srž jer omogućavaju: izbjegavanje opće anestezije pri vađenju koštane srži, manja je kontaminacija malignim stanicama (npr. zahvaćenost koštane srži osnovnom bolešću), brži hematološki oporavak, smanjuju primjenu transfuzija krvnih komponenti, a uz to smanjuju vrijeme hospitalizacije. [6, 10]

3.4.1. Priprema pacijenta prije sakupljanja

Postupak leukafereze ne zahtijeva hospitalizaciju i može se provoditi ambulantno. Davatelj treba biti nadziran tijekom cijelog postupka zbog moguće pojave neželjenih reakcija. Vitalni znakovi (krvni tlak i puls) trebaju biti zabilježeni na početku leukafereze te potom svakih 30 minuta tijekom prikupljanja, a davateljevo stanje treba nadzirati i nakon leukafereze zbog mogućnosti pojave trombocitopenije i anemije koje treba prije sljedećeg postupka leukafereze zbrinuti transfuzijskim liječenjem.

Cilj sakupljanja KMS iz periferne krvi je sa što manjim brojem postupaka leukafereze sakupiti dovoljan broj CD34+ stanica za transplantaciju. Stoga je veoma važno započeti sakupljanje u trenutku kada se u perifernoj krvi bolesnika nalazi najveći broj CD34+ stanica. Do povećanja broja KMS u perifernoj krvi ne dolazi uvijek u isto

vrijeme jer bolesnici različito reagiraju na moblizaciju zbog učinka dobi, dijagnoze, vrste i trajanja prethodnog liječenja. Za odabir optimalnog vremena za početak sakupljanja nakon mobilizacije kemoterapijom i G-CSF-om predloženo je nekoliko pokazatelja u perifernoj krvi: leukociti, mononuklearne stanice i CD34+ stanice. Budući da se broj leukocita u perifernoj krvi može brzo odrediti, u mnogim centrima leukafereza započinje na dan kada je broj leukocita veći od 10^9/L. Međutim, broj leukocita i mononuklearnih stanica određen neposredno prije početka leukafereze pokazuje vrlo slabu korelaciju s brojem CD34+ stanica sakupljenih tijekom leukafereze. Između apsolutnog broja CD34+ stanica u perifernoj krvi prije leukafereze i broja CD34+ stanica sakupljenih u produktu dokazana je dobra korelacija. Brojna istraživanja su se bavila pitanjem koji je najmanji broj CD34+ stanica u perifernoj krvi kada ima smisla započeti leukaferezu. Danas se smatra da je najbolje započeti leukaferezu kada je broj CD34+ stanica u perifernoj krvi veći od $10x10^6$/L. Nakon svakog postupka leukafereze određuje se sakupljen broj CD34+ stanica i leukafereza se nastavlja slijedećih dana dok se ne sakupi ciljni broj stanica. Koliki će broj postupaka leukafereze biti potreban za sakupljanje ciljnog broja stanica ovisi o stupanju mobilizacije KMS u perifernu krv, pravovremenom početku sakupljanja kao i tehnici sakupljanja. Primjena učinkovite tehnike sakupljanja je važna jer utječe direktno na sveukupni broj CD34+ stanica u produktu, a time smanjuje broj potrebnih leukafereza, razdoblje primjene citokina i troškove sakupljanja. [1]

3.4.2. Postupak sakupljanja krvotvornih matičnih stanica

Stanični separatori koji se rabe za prikupljanje krvnih sastojaka kao što su trombociti, eritrociti i plazma mogu se rabiti i za prikupljanje KMS. Ovisno o vrsti stanica koje se žele prikupiti rabe se različiti računalni programi koji nadziru rad separatora. Na tržištu se trenutačno nalazi nekoliko staničnih separatora različitih proizvođača koji se međusobno razlikuju po stupnju automatizacije, volumenu krvi koji se nalazi izvantjelesno u staničnom separatoru, učinkovitosti prikupljanja te gubitku eritrocita i trombocita tijekom prikupljanja. Stanični separatori izdvajaju ciljne skupine stanica raslojenih centrifugiranjem krvi. Puna se krv tijekom diferencijalnog centrifugiranja raslojava u slojeve s obzirom na specifičnu gustoću krvnih sastojaka:

eritrocite, granulocite, limfocite i monocite, trombocite te plazmu. Budući da se CD34+ stanice, koje veličinom odgovaraju manjim limfocitima, nalaze u frakciji limfocita i monocita, postupkom leukafereze se iz periferne krvi izdvajaju mononuklearne stanice, dok se ostale krvne stanice vraćaju bolesniku. Kako slojevi stanica nisu oštro razgraničeni, tijekom leukafereze se prikuplja i dio stanica s obje strane sloja mononuklearnih stanica. Hematokrit produkta se tijekom leukafereze održava u rasponu od 2 do 3%. Prikupljanje veće količine eritrocita tijekom leukafereze nije poželjno jer može u davatelja izazvati anemiju. Isto tako, previše eritrocita u produktu leukafereze može tijekom reinfuzije transplantata u primatelja izazvati nuspojave. Budući da eritrociti nakon odmrzavanja hemoliziraju i oslobađaju slobodni hemoglobin u transplantat, infuzija veće količine slobodnog hemoglobina u primatelja može oštetiti funkciju bubrega. Tijekom leukafereze se uz mononuklearne stanice prikupljaju i trombociti. Važno je prikupiti što manje trombocita jer se na taj način u davatelja izbjegava nastanak trombocitopenije, kao i stvaranje ugrušaka u produktu leukafereze zbog prevelikog broja trombocita. [8]

3.4.2.1. Vrste staničnih separatora

Na tržištu se trenutno nalazi nekoliko staničnih separatora različitih proizvođača:

Spectra Optia (Caridian BCT, Lakewood, CO, SAD) je sustav s kontinuiranim protokom i automatskim uspostavljanjem, praćenjem i podešavanjem sloja stanica koji se prikuplja. Postupak leukafereze je pojednostavljen, smanjuje potrebu ručnog podešavanja, a time smanjuje mogućnost pogreške i poboljšava učinkovitost postupka. Istovremeno omogućava operateru jednostavan unos i izračun podataka bez potrebe za manualnim računanjem. Prednost Spectra Optije je što se zbog dvostrukog centrifugiranja stanica tijekom leukafereze prikuplja manji broj tromobocita što kod davatelja smanjuje rizik nastanka trombocitopenije.



Slika 2. Stanični separator Spectra Optia [7]

COBE Spectra (Caridian BCT, Lakewood, CO, SAD) je sustav s kontinuiranim protokom koji koristi separacijsku komoru u obliku omče i zahtijeva dvostruki venski pristup. Cobe Spectra ima dva programa za prikupljanje KMS. MNC program (verzija 4.7, 5.1, 6.1 i 7.0) koristi jednokanalnu separacijsku komoru, a Auto PBSC program (Version 6.1) koristi dvokanalnu separacijsku komoru. MNC program je poluautomatski pa operater može nadzirati prikupljanje stanica uz kolorogram (engl. colored scale). Operater podešava protok pumpe separatora i na taj način nadzire boju produkta u liniji za prikupljanje. Produkt treba biti svijetlo ružičaste boje što odgovara vrijednosti hematokrita od 2 do 3%. Auto PBSC program u cijelosti automatski nadzire postupak prikupljanja na osnovi podataka o bolesniku i broju stanica u perifernoj krvi koji su uneseni na početku procedure.



Slika 3. Stanični separator COBE Spectra [7]

Baxter CS 3000 Plus (Baxter Biotech, Deerfield, IL, SAD) je stanični separator s kontinuiranim protokom s dvije serijske separacijske komore za izolaciju mononuklearnih stanica. **Amicus** (Baxter Biotech, Deerfield, IL, SAD) je separator nove generacije koji automatski prikuplja mononuklearne stanice s jednostrukom komorom, a proces izdvajanja odvija se u fazama. Mononuklearne stanice se intermitentno prikupljaju u vrećicu s produktom.



Slika 4. Stanični separator CS 3000 Plus [7]



Slika 5. Stanični separator Amicus [7]

Fresenius AS 104 (Fresenius USA, Walnut Creek, CA, SAD) je stanični separator s kontinuiranim protokom koji koristi dvostupanjsku separacijsku komoru. U prvoj fazi prikuplja se plazma bogata trombocitima i mononuklearnim stanicama koje se koncentriraju u slijedećoj fazi.



Slika 6. Stanični separator Fresenius AS 104 [7]

COM.TEC separator (Fresenius Hemocare Bad Homburg, Njemačka) ima dva programa, LP-MNX koji koristi jednostupanjsku komoru i LP-KMS-Lym program koji koristi dvostupanjsku komoru.

Haemonetics MCS Plus (Haemonetics Corp., Braintree, MA, SAD) je separator s intermitentnim protokom koji za separaciju krvi koristi Lathamovu kuglu u obliku zvona. Zbog diskontinuiranog protoka krvi koristi samo jedan venski pristup, ali postupak leukafereze zbog toga traje značajno duže. [7]



Slika 8. Stanični separator Haemonetics MCS plus [7]

3.4.2.2. Venski pristup

Za postupak leukafereze potrebno je osigurati adekvatan venski pristup koji će omogućiti kontinuirani protok krvi kroz stanični separator od 50 do 100 ml/min. Preporuke su da se kad je god moguće za venski pristup upotrebljavaju periferne vene. Ovakav protok je moguće osigurati kroz periferne vene kubitalne i podlaktične regije uvođenjem igala za aferezu ili intravenskih kanila. Adekvatan promjer igala za aferezu/ intravenskih kanila je minimalno 16 do 18 gaugea za uzimanje krvi te 19 gaugea za povrat krvi iz staničnog separatora. Međutim, više od 60% pacijenata i 10% darivatelja KMS-a nemaju zadovoljavajuće periferne vene za osiguravanje tako visokog protoka krvi kroz stanični separator. Zbog neadekvatnih perifernih vena pristupa se uvođenju centralnog venskog katetera koji je jedino praktično rješenje kod osoba s neadekvatnim perifernim venama. Za postupak leukafereze najčešće se koriste specijalni dvoluminalni kateteri promjera 12 Fr namijenjeni za hemodijalizu i aferezu. Izrađeni su od poliuretana ili silikonske gume te zbog velikog lumena osiguravaju zadovoljavajući protok za pumpe staničnog separatora, a istovremeno je zbog debljine i čvrstoće stijenki onemogućeno sljepljivanje istih pod utjecajem negativnog tlaka kojeg proizvodi stanični separator. Poliuretanski kateteri su čvršći i namijenjeni za primjenu u kraćem razdoblju (do 3 tjedna), ali najčešće se odstranjuju odmah nakon završetka prikupljanja i zamrzavanja transplantata KMS-a. Silikonski kateter se pacijentu postavlja kad se isti kateter planira upotrijebiti i za prikupljanje KMS-a i tijekom transplantacije. Odabir mjesta insercije centralnog venskog katetera ovisi o anatomskim značajkama pacijenta/darivatelja, njegovim osobnim preferancijama i iskustvu djelatnika transplantacijskog centra. Centralni venski kateter se može postaviti u venu subklaviju, venu jugularis internu i venu femoralis, a svako mjesto insercije ima svoje prednosti i nedostatke. Vena subklavija i vena jugularis interna su najčešća mjesta insercije centralnog venskog katetera te su pogodne za kateter za aferezu. Postavljanje ovih katetera često prate komplikacije kao što su pneumotoraks i hematotoraks, a tijekom korištenja moguće su infekcije i nastanak tromboze. Prednost femoralnog katetera je što se može brzo postaviti, manji je broj nuspojava pri postavljanju, ne zahtijeva radiološku kontrolu položaja, a nedostatak je veći rizik za nastanak infekcije i ograničena pokretljivost bolesnika. Ovisno o transplantacijskom centru, prohodnost centralnog venskog katetera se između postupaka leukafereze održava ispiranjem fiziološkom

otopinom i/ili konzerviranjem krakova katetera otopinom heparina. Razlike u načinu održavanja prohodnosti centralnog venskog katetera proizlaze iz istraživanja provedenog među pacijentima s malignim bolestima koji su imali centralni venski kateter zbog leukafereze koje je pokazalo da nije bilo značajne razlike u pojavi tromba oko katetera, bez obzira je li kateter bio konzerviran heparinom (100 i.j./mL fiziološke otopine) ili samo fiziološkom otopinom (Haire WD, Lieberman RP, Lund GB et al. 1990). Izbjegavanjem konzerviranja katetera heparinom također se sprječava trombocitopenija izazvana heparinom i tromboza koje su rijetke, ali vrlo ozbiljne komplikacije. [7]

3.4.2.3. Sprječavanje zgrušavanja

Uzimajući u obzir da je krv u izvantjelesnoj cirkulaciji u staničnom separatoru izložena neendotelnim površinama, tijekom leukafereze dolazi do aktivacije sustava zgrušavanja krvi. Sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom leukafereze je potrebno za osiguranje kvalitete dobivenog produkta te osiguranje sigurnosti pacijenta/darivatelja. Za sprječavanje zgrušavanja krvi tijekom postupka leukafereze najčešće se koristi otopina citrata koji stvara nedisocirane komplekse kalcijeva citrata i inhibira agregaciju trombocita. Najčešće korištena antikolagulantna otopina za prikupljanje KMS je ACD-A (engl. *Acid Citrate Dextrose Formula-A*). ACD-A je sterilna otopina limunske kiseline, natrijevog citrata i dekstroze, a jedna litra sadrži 14,15 g citrata iz natrijevog citrata i 7, 18 g citrata iz limunske kiseline (ukupno 21,33 g citrata). Tijekom prikupljanja, puna krv ulazi u stanični separator uz ulazni protok od 50 do 100 mL/min te se miješa s antikoagulantnom otopinom u različitim omjerima. Pri leukaferezi velikog volumena ukupan volumen se obradi od 3 do 6 puta, a krv se miješa s antikoagulansom u omjeru 24:1, a 6 i.j. heparina se dodaje na svaki mililitar ACD-A. ACD-A se također dodaje u vrećicu s produktom leukafereze zbog sprječavanja stvaranja ugrušaka. Heparin se kao jedini antikoagulans koristi samo u bolesnika koji su alergični na citrat. Nedovoljna ili netočna primjena antikoagulansa tijekom postupka može aktivirati koagulaciju i uzrokovati pojavu ugrušaka u staničnom separatoru i/ili u prikupljenom produktu. S druge strane, suvišak citrata u krvi bolesnika može izazvati simptome hipokalcemije uslijed smanjenja razine ioniziranog kalcija. [7]

3.4.2.4. Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica u djece

Iako je tehnološki slično prikupljanju KMS u odraslih, prikupljanje KMS iz periferne krvi u djece ima mnogo specifičnosti na koje treba obratiti pozornost, a to su: veliki volumen krvi djeteta u izvantjelesnoj cirkulaciji, potreban protok krvi kroz stanični separator, vrsta antikoagulantne otopine koja će se primijeniti te osiguravanje kvalitetnog venskog pristupa. Najčešći problemi koji se mogu javiti tijekom postupka leukafereze su povezani s venskim pristupom, velikim volumenom krvi djeteta u izvantjelesnoj cirkulaciji te smanjenom suradljivošću djeteta. Unatoč ovim potencijalno ograničavajućim faktorima, postupkom leukafereze moguće je u djece uspješno prikupiti KMS. Za prikupljanje KMS kod djece se može upotrijebiti bilo koji stanični separator s kontinuiranim protokom, a postupak se može provesti uglavnom bez sedacije. Za uspješno prikupljanje KMS je neophodno osigurati dobar protok krvi kroz stanični separator, a promjer dječjih perifernih vena nije dovoljno velik da to osigura. Stoga se ovisno o veličini djeteta, a time i promjeru njegovih krvnih žila, postavljaju različite vrste i veličine centralnih venskih katetera. Ako je moguće, potrebno je postaviti dvoluminalni kateter (10 Fr), a ako to nije moguće, postavljaju se dva jednoluminalna katetera u dvije različite vene (7-9 Fr). Jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika za leukaferezu u djece je njihov mali ukupni volumen krvi. U izvantjelesnoj cirkulaciji se tijekom leukafereze u staničnom separatoru nalazi od 180 do 370 ml krvi pacijenta/darivatelja ovisno o vrsti staničnog separatora, a to kod djece može iznositi i preko 40% njihovog ukupnog volumena krvi. Takav veliki pomak krvi u izvantjelesnu cirkulaciju (veći od 10 do 15% ukupnog volumena krvi) uzrokuje hipovolemiju, hemodiluciju i hemodinamske promjene. Za sprječavanje hipovolemije i hemodilucije, prije početka samog postupka leukafereze potrebno je ispuniti set za prikupljanje staničnog separatora imunohematološki podudarnim ozračenim koncentratom eritrocita sa smanjenim brojem leukocita. Različiti autori imaju različite stavove kad je potrebno primijeniti postupak ispune seta staničnog separatora koncentratom eritrocita. Hipovolemija i hemodilucija se mogu očitovati bljedoćom i znojenjem, hipotenzijom, tahikardijom, pa čak i hipovolemičkim šokom. Obzirom da se tijekom postupka leukafereze za sprječavanje zgrušavanja koristi otopina citrata koja izaziva velike metaboličke promjene, kod djece su te promjene izraženije nego kod odraslih. Uzrok tome je smanjena mogućnost metaboliziranja citrata u jetri, pa se češće

javljaju simptomi hipokalcemije. Kod djece su blaži simptomi hipokalcemije nespecifični (bol u trbuhu i znojenje), a teži simptomi su poremećaj srčanog ritma i hipotenzija. Stoga je potrebno pozorno pratiti stanje djeteta da se na vrijeme uoče nespecifični simptomi te da se spriječi nastanak težih neželjenih reakcija povezanih s toksičnošću citrata. Za sprječavanje nastanka hipokalcemije tijekom postupka leukafereze potrebna je kontinuirana profilaktična primjena infuzije kalcija.

Unatoč svim navedenim specifičnostima prikupljanja KMS kod djece, učestalost nastanka neželjenih reakcija nije veća od onih nakon opće anestezije ili vađenja koštane srži te se većina njih može spriječiti individualnim prilagođavanjem tehnike prikupljanja svakom djetetu. Prikupljanje KMS u djece postupkom leukafereze može biti stresno, kako za dijete, tako i za roditelje. Roditeljima je potrebno iscrpno objasniti tijek postupka i moguće neželjene reakcije i na taj način smanjiti njihovu zabrinutost te omogućiti sudjelovanje u praćenju stanja djeteta tijekom samog postupka. Nadaljr, roditeljima, braći i sestrama treba omogućiti boravak uz dijete te prilagoditi okolinu potrebama djeteta obzirom na duljinu trajanja postupka jer se na taj način smanjuje napetost djeteta i poboljšava suradljivost. [7]

3.5. Obrada pripravaka krvotvornih matičnih stanica

Nakon provedene leukafereze slijedi proces obrade pripravaka dobivenih KMS-a. Ti postupci se mogu podijeliti na rutinske i specijalizirane.

Rutinski se postupci primjenjuju za koncentriranje KMS-a ili uklanjanje nepotrebnih stanica i/ili plazme. Temelje se na jednostavnim fizikalnim metodama odvajanja stanica prema veličini i gustoći nakon centrifugiranja primjenom staničnih separatora ili staničnih procesora, odvajanjem stanica pomoću različitih otopina (npr. koloidne otopine HES-a (hidroksietil škrob) za sedimentaciju eritrocita) i istiskivača plazme (ručnih i automatskih). Oprema za izvođenje rutinskih postupaka standardna je oprema koja se upotrebljava u proizvodnji i preradi krvnih pripravaka. [5]

Tablica 3.3.a) Rutinski postupci obrade krvotvornih matičnih stanica

Postupak	Primjena
Koncentriranje KMS	-smanjenje volumena prije zamrzavanja KMS-a -prvi korak u složenoj obradi KMS-a: uklanjanje eritrocita i plazme prije daljnje obrade
Uklanjanje plazme	-uklanjanje ABO nepodudarne plazme uklanjanje ABO nepodudarnosti -sprječavanje preopterećenja krvotoka u primatelja (djeca, bolesnici male tjelesne mase, srčani i bubrežni bolesnici) -smanjenje volumena prije zamrzavanja
Uklanjanje eritrocita	-sprječavanje hemolize u slučajevima velike ABO nepodudarnosti ili u bolesnika s klinički značajnim antieritrocitnim protutijelima ostalih specifičnosti -ograničavanje količine slobodnog hemoglobina nakon odmrzavanja
Otapanje	-otapanje zamrznutog pripravka KMS-a prije transplantacije
Pranje	-uklanjanje DMSO-a i hemoliziranih eritrocita radi smanjenja toksičnosti
Filtracija	-uklanjanje agregata stanica prije transplantacije

Specijalizirani postupci primjenjuju se radi postizanja veće čistoće i učinkovitosti pripravaka KMS-a. Za takve postupke potrebnu su posebna oprema i reagensi koji se rabe u staničnom inženjerstvu. Tablica ispod teksta prikazuje što sve ulazi u specijalizirane postupke obrade KMS-a. [5]

Tablica 3.3.b) Specijalizirani postupci obrade krvotvornih matičnih stanica

Postupak	Primjena
Centrifugalna elutricija	-odvajanje staničnih subpopulacija (koncentriranje mononukleara, uklanjanje limfocita T)
Stanična selekcija	-pozitivna i negativna selekcija stanica temeljena na izražaju staničnih biljega (npr.imunomagnetska)
Ekspanzija stanica in vitro	-povećanje broja KMS-a i prastanica radi bržeg oporavka i boljeg ishoda transplantacije
Ostalo	-uklanjanje zloćudnih stanica i čišćenje transplantata monoklonskim protutijelima -farmakološko čišćenje pripravaka KMS-a

3.5.1. Kontrola kvalitete pripravaka krvotvornih matičnih stanica

Kontrola kvalitete pripravaka KMS-a mora obuhvaćati testove kojima se mogu: 1. procijeniti učinkovitost i sigurnost staničnog pripravka, 2. nadzirati kvaliteta postupaka sakupljanja, obrade i pohrane stanica. Opseg kontrole pripravaka ovisi o kliničkoj namjeni stanica i o složenosti postupaka proizvodnje.

Ishod transplantacije KMS-a ovisi o broju presađenih stanica i njihovoj klonogenoj sposobnosti. Na osnovu navedenoga su se definirali ključni elementi za procjenu kvalitete pripravaka KMS-a, a to su: broj stanica s jezgrom, udio pojedinih vrsta stanica, udio stanica sa specifičnim obilježjima (od kojih je najvažniji CD34), vijabilnost stanica, klonogena sposobnost stanica u staničnim kulturama in vitro i mikrobiološko testiranje.

U razmazu koštane srži KMS se morfološki ne mogu razlikovati od malog limfocita. Zbog toga se radi točnijeg određivanja koriste imunofenotipizacija i funkcionalni testovi uzgoja stanica in vitro. Najvažniji identifikacijski biljeg KMS-a jest antigen CD34 koji se određuje metodom protočne citometrije. Budući da se taj biljeg nalazi i na prastanicama u ranoj fazi diferencijacije, sve CD34 pozitivne stanice nisu krvotvorne matične stanice. Poznato je da KMS na površini ne izražavaju diferencijacijske antigene staničnih linija (engl. *lineage marker negative*, Lin-), ni antigene HLA-DR i CD38. Budući da se još uvijek ne zna točan izgled ni imunološki fenotip KMS-a, za procjenu njihova broja u transplantatu, tj. kvalitete presatka u rutini se primjenjuju surogatni testovi kao što su broj stanica s jezgrom (engl. nucleated cells – NC), broj mononuklearnih stanica (engl. *mononuclear cells*, MNC), identifikacija CD34 pozitivnih stanica i kratkotrajna kultura stanica in vitro za dobivanje broja granulocitno-monocitnih kolonija (engl. *colony-formnig unit granulocyte-monocyte*, CFU-GM) i eritroidnih kolonija (engl. *burst-forming unit-erythroid*, BFU-E). Također, neizostavni dio kontrole kvalitete pripravaka KMS-a jest praćenje brzine oporavka krvnih stanica nakon transplantacije za svakog pojedinog bolesnika. [5]

3.5.1.1. Broj i vrsta stanica

Brojenje stanica u pripravcima KMS-a je osnovni test kojim se procjenjuje kvaliteta pripravaka, kao i učinkovitost postupaka za uzimanje i obradu KMS-a. No, broj MC ili MNC malo je koristan za procjenu broja KMS-a u pripravku jer je korelacija između broja zrelih krvnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi i broja KMS-a među njima veoma slaba. Ipak, u nedostatku boljeg pokazatelja, broj NC još se i danas rabi u procjeni kvalitete pripravaka KMS-a podrijetlom iz koštane srži. Za uspješnu autolognu transplantaciju pripravak KMS-a iz koštane srži treba imati $2x10^8$ NC/kg tjelesne težine, a za alogeničnu $3x10^8$ NC/kg tjelesne težine. Minimalan broj NC za transplantaciju KMS-a iz pupkovine mora biti oko $3x10^7$ NC/kg. Kada postoji veći rizik od neprihvaćanja translpantata, kao što je slučaj u bolesnika s aplastičnom anemijom ili kod HLA haploidentičnih transplantacija, za uspjeh presadbe potreban je dvostruki broj stanica negoli u standardnom presatku.

Tijekom brojenja stanica u uzorcima presatka s pomoću automatskih brojača može doći do nekih tipičnih greški primjerice:u uzorcima koštane srži automatski brojač može nakupine masti veličine NC brojiti kao stanice, u uzorcima krvi iz pupkovine u ukupan broj NC mogu se ubrojiti i eritrocitoblasti koji ne bi trebali biti uključeni u broj stanica kada se procjenjuje kvaliteta presatka, a u uzorcima KMS-a dobivenih aferezom iz periferne krvi broj stanica može biti vrlo visok, pa pogreška može nastati zbog ograničenja brojača ili nepreciznosti pri razrjeđivanju uzoraka. [5]

3.5.1.2. Imunofenotipizacija krvotvornih matičnih stanica

Određivanje broja CD34 pozitivnih stanica protočnom citometrijom danas je rutinska metoda za određivanje broja KMS-a u krvi bolesnika i u transplantatu. Ova metoda dobro korelira s brojem KMS-a i brzinom oporavka krvnih stanica nakon transplantacije. Uz navedeno, ova metoda je dobra jer priprema uzorka i mjerenje traje oko jednog sata tako da se rezultati dobivaju relativno brzo. To omogućuje pravodobnu i klinički relevantnu procjenu kvalitete pripravaka KMS-a u okolnostima kada treba donijeti odluku o početku ili o nastavku skupljanja KMS-a. [5]

Inače, tehnike protočne citometrije pronalaze sve važnije mjesto u suvremenoj kliničkoj medicini ponajviše zahvaljujući činjenici da ona omogućuje objektivnu, osjetljivu, brzu i točnu analizu relativno velikog broja staničnih svojstava. Iako je svoju primjenu našla i u drugim granama medicine, kao što su patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina, ona se ipak najčešće koristi u hematologiji i imunologiji. Protočna citometrija kakvu poznajemo danas poznata je već 30-ak godina, mada su se slični oblici mjerenja protočnim sustavom pomoću rasapa svjetla pojavili i ranije. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Cjelokupni protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnom protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica - veličine

(svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5-10°, FSC - prema engl. *forward scatter*) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. *side scatter*). [13] Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili (ponajčešće) za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (*fluorokromima*) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični detektori protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti stanica (FSCxSSC) na kojem se postavlja regija analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da stanice prije analize nije potrebno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu mjerenja signala (>103 stanica u sekundi) te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala), pa se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do desetak parametara. Iako je do danas razvijen velik broj protočnocitometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja i/ili funkcija, ona se još uvijek ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanje specifičnih staničnih biljega, te je zbog toga neizostavna metoda pri pripremi pripravaka krvotvornih matičnih stanica za transplantaciju. [14]

Prednosti određivanja broja CD34+ stanica u krvi protočnom citometrijom su brzina (mjerenje se može izvršiti unutar 1 sata), osjetljivost (analiza do 500000 stanica u nekoliko minuta) i reproducibilnost. Rezultat se izražava kao postotak CD34+ stanica u određenim leukocitnim odjeljcima periferne krvi ili koncentrata leukocita (produkta leukefereze), no najvažniji podatak jest udio tih stanica na ukupan broj leukocita. U perifernoj krvi taj se podatak izražava brojem CD34+ stanica u mikrolitru krvi (kada se odlučuje treba li započeti postupak njihovog prikupljanja leukaferezom), odnosno broj CD34+ stanica u prikupljenom koncentratu leukocita. Danas se za takve izračune primjenjuju dvije metode: jedna se oslanja na udio CD34+ stanica među leukocitima i podatke o broju leukocita s hematološkog brojača (*double-platform*), dok najnovija metodologija zahtijeva izračun svih vrijednosti na samom protočnom citometru, za što se koriste posebne baždarne kuglice (*single-platform*). Općenito, prikupljanje matičnih

stanica periferne krvi započinje kada broj CD34+ stanica u mikrolitru krvi iznosi 10-20, a sve u cilju da bi se povećala vjerojatnost prikupljanja dovoljnog broja CD34+ stanica čak i samo jednim postupkom leukafereze, tj. da se dobije željeni broj od $2\text{-}4\times10^6$ CD34+ stanica po kilogramu tjelesne težine primatelja. [15]

Valja obratiti pažnju i na pogreške koje su moguće u mjerenju broja CD34-pozitivnih stanica, a koje mogu nastati zbog loše uzetog uzorka, loše kalibracije protočnog citometra, izbora protutijela i metode lize eritrocita. Bolja standardizacija mjerenja postignuta je uvođenjem dobro definiranih protokola od kojih svaki ima neke prednosti i nedostatke. [5]

3.5.1.3. Vijabilnost stanica

Vijabilnost stanica može se ispitati bojenjem uzorka KMS tripanskim modrilom i brojanjem obojenih stanica pod svjetlosnim mikroskopom. S obzirom na to da se stanična membrana mijenja nakon smrti stance, ali i tijekom čuvanja, odnosno laboratorijske obrade i zamrzavanja, mijenja se i količina boje koja ulazi u stanicu. Obojene stanice su mrtve i nemaju sposobnost diobe. S obzirom na to da je broj stanica koji se analizira mali, a broj analiziranih KMS-a još manji, ovaj test ima ograničenu korist u procjeni kvalitete pripravaka KMS-a. [5] Osim na taj način, vijabilnost stanica se može procjenjivati i protočnom citometrijom bojenjem propidijskim jodidom ili 7-amino actinomycinom D (7-AAD). Međutim, mora se naglasiti da ove metode ne ispituju direktno sposobnost stanica da ponovno nasele koštanu srž. Mnogo prikladnija metoda određivanja vijabilnosti stanica je *in vitro* kultura krvotvornih prastanica čime se određuje klonogeni potencijal, točnija mjera vijabilnosti udružena s brojanjem CD34+ stanica. [1]

3.5.1.4. Kratkotrajna kultura KMS-a

Za ispitivanje klonogene sposobnosti pripravaka KMS-a upotrebljava se kratkotrajna kultura stanica s dodatkom različitih činitelja rasta. U staničnoj se kulturi

mogu prepoznati granulocitne (CFU-GM), eritroidne (BFU-E) i mješovite kolonije krvotvornih stanica. Klonogena sposobnost KMS-a procjenjuje se prema broju naraslih kolonija pojedine krvne loze u odnosu na ukupan broj zasađenih stanica. Za rast kolonija potrebno je nekoliko tjedana inkubacije stanica na hranjivim podlogama, u sterilnim uvjetima i u staničnom inkubatoru, što zahtijeva specifičnu opremu i izvježbano osoblje. Budući da se rezultat kultura treba čekati dva tjedna, ovaj se test ne može primjenjivati u brzoj procjeni kvalitete pripravaka KMS-a. Test je teško standardizirati zbog velikog broja činitelja koji utječu na rast stanica npr. vrsta medija i reagensa. To često uzrokuje nereproducibilnost rezultata osobito između različitih laboratorija. Iz tog razloga nema općeprihvaćenog minimalnog broja kolonija naraslih in vitro koji bi s velikom vjerojatnošću osigurao hematološki oporavak bolesnika nakon transplantacije KMS-a, iako neki istraživači preporučuju optimalan broj CFU-GM-a > $6x10^5$ po kilogramu tjelesne težine primatelja. Tehnička složenost i nedostatak pouzdane kliničke korelacije s rezultatima funkcionalnih testova razlog su zbog kojeg se kultura stanica u mnogim centrima više ne rabi u rutinskoj kontroli kvalitete pripravaka KMS-a. [5]

3.5.1.5. Mikrobiološko testiranje

Dobra laboratorijska praksa nalaže da svaki laboratorij ima organiziran program nadzora reagensa i tehnika sakupljanja te obrade produkta s ciljem otkrivanja odstupanja od aseptičnih tehnika i sprečavanja mikrobiološke kontaminacije. Važeći standardi i preporuke zahtijevaju provođenje bakterijske i mikološke kulture pripravka KMS kako nakon sakupljanja tako i nakon obrade. [1] Mikrobiološko testiranje obuhvaća: 1. ispitivanje darivatelja KMS-a na uzročnike zaraznih bolesti koje se prenose krvlju radi sprječavanja prijenosa infekcije s davatelja na bolesnika tijekom infuzije ili iz jednog pripravka u drugi tijekom pohrane u tekućem dušiku, 2. ispitivanje pripravaka KMS-a na moguće bakterijsko onečišćenje tijekom uzimanja, obrade ili pohrane KMS-a. Rizik od prijenosa zaraznih bolesti ovisi o: izvoru KMS (autologni ili alogenični), načinu uzimanja, postupcima laboratorijske obrade te načinu pohrane.

Uzorci za mikrobiološku kontrolu uzimaju se iz pripravaka KMS-a na kraju laboratorijske obrade, a prije zamrzavanja pripravaka. [5] Za analizu mikrobiološke

kontaminacije uzima se mali volumen produkta, od 1 do 5 mL, ovisno o veličini produkta i tehnici kulture u mediju koji podupire aerobne i anaerobne bakterije te gljivice. Jedan od izvora mikrobiološke kontaminacije može biti kateter za aferezu koji se može inficirati tijekom upotrebe, obično s florom kože. Druga je mogućnost da se tijekom leukafereze sakupi i mikroorganizam koji se već nalazi u krvi bolesnika. Ako je bolesnik febrilan tijekom leukafereze obavezno je uz hemokulturu produkta afereze učiniti i hemokulturu bolesnikove krvi. Odmah nakon dobivanja informacije o bakterijskom onečišćenju pripravaka krvotvornih matičnih stanica, laboratorij mora o tome obavijestiti bolesnikova liječnika kako bi se donijela odluka o daljnim postupcima. Pripravci KMS-a iz koštane srži imaju visok rizik od bakterijskog onečišćenja tijekom uzimanja KMS-a zbog višekratnog punktiranja kože i vrećice za sakupljanje KMS-a. Gotovo isključivo riječ je o bakterijama koje pripadaju normalnoj kožnoj flori. To onečišćenje malokad uzrokuje kliničku infekciju nakon reinfuzije KMS-a. Rizik od bakterijskog onečišćenja nizak je za pripravke KMS-a dobivenih aferezom iz periferne krvi jer je vrećica za uzimanje sastavni dio jednokratnoga zatvorenog seta za stanični separator. S druge strane, bakterijska onečišćenja nastala u tijeku obrade pripravaka KMS-a imaju znatno težu kliničku sliku jer je uglavnom riječ o patogenim bakterijama, a ne o saprofitima kože. [5]

Mikrobiološki kontaminirani produkti ne moraju obavezno biti uništeni, jer je poznato da infuzija kontaminiranog produkta ne uzrokuje uvijek infekciju u primatelja. Odluku o postupku s mikrobiološki kontaminiranim produktom donosi bolesnikov liječnik nakon razmatranja vrste uzročnika i potencijalne koristi i rizika primjene kontraminiranog produkta. [1]

3.5.1.6. Analiza kontaminacije tumorskim stanicama

Metode za određivanje tumorske kontaminacije produkta leukafereze trebale bi otkriti razinu kontaminacije od 1 tumorske stanice na 10^3 do 10^5 normalnih stanica ili manje. Ukoliko su dostupne molekularne probe za jedinstvene DNA slijedove tumorskih stanica, metoda polimeraze lančane reakcije (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) može otkriti izuzetno mali broj malignih stanica. [16]

Već dugo vremena sporno je pitanje doprinose li maligne stanice u transplantatu relapsu nakon autologne transplantacije. Ovo pitanje je osobito važno za bolesti koštane srži kao što su akutne leukemije. Naime, ako su leukemijske stanice prisutne u vrijeme leukafereze, za očekivati je da i te stanice mogu biti sakupljene i zamrznute. Upravo su iz tog razloga neki transplantacijski centri posvetili značajne napore u razvitak metoda uklanjanja ili «čišćenja» malignih stanica iz transplantata koštane srži. Istraživanje Brennera i sur. je pokazalo da minimalna ostatna bolest u transplantatu koštane srži može doprinijeti relapsu nakon transplantacije u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom. Iako se čini da maligne stanice koje se nalaze u transplantatu koštane srži mogu doprinijeti relapsu nakon transplantacije kod bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom i možda kod ne-Hodgkinovog limfoma isto se ne može zaključiti za transplantaciju KMS sakupljenih iz periferne krvi jer se smatra da bi transplantat KMS sakupljen iz periferne krvi mogao sadržavati manji broj malignih stanica od transplantata koštane srži. [17, 18]

3.6. Zamrzavanje pripravaka krvotvornih matičnih stanica

Budući da standardni pripravak leukafereze ima volumen veći od 200 ml, potrebno je prije zamrzavanja stanica koncentrirati i smanjiti volumen pripravka na 50 do 70 ml. To je omogućeno na način da se sve stanice u produktu leukafereze sedimentiraju centrifugiranjem, a nakon toga se volumen pripravka smanjuje uklanjanjem plazme iznad leukocitno trombocitnog sloja stanica (engl. *buffy coat – BC*). Još se jednom naglašava da izdvajanje BC kao i svi ostali postupci s BC-om i plazmom zahtijevaju rad u aseptičkim uvjetima, pa se taj postupak izvodi u kabinetu za sterilni rad. Rad u aseptičkim uvjetima omogućen je stalnom izmjenom filtriranog zraka koji struji unutar radnog prostora kabineta.

Otkrićem krioprotektivnog svojstva glicerola i dimetilsulfoksida (DMSO) koji sprječavaju dehidraciju stanica postalo je moguće zamrzavanje stanica. Taj postupak omogućio je dugotrajnu pohranu KMS-a bez većeg gubitka njihove vijabilnosti i nakon višegodišnjeg čuvanja na niskim temperaturama. Upravo ta činjenica iskorištava se u

liječenju autolognom transplantacijom KMS-a i za pohranu krvi iz pupkovine za srodnu i nesrodnu transplantaciju. [5]

Moguće je da se prilikom postupka zamrzavanja desi oštećenje stanica zbog stvaranja kristala leda. Koliko će oštećenje bit ovisi o brzini zamrzavanja. Ukoliko je zamrzavanje brzo, kristali leda nastaju u stanici, što uzrokuje mehaničko oštećenje stanice i njezinu smrt. S druge strane, ako je proces zamrzavanja sporiji kristali leda nastaju pretežno u izvanstaničnim prostorima. Slobodne se molekule vode vežu u kristale leda, što uzrokuje koncentriranje soli u izvanstaničnome prostoru koje više ne ulaze slobodno u stanicu, hiperosmolarnost i oštećenja stanice zbog dehidracije. [5]

3.6.1. Dugotrajna pohrana

Većina laboratorija čuva KMS na temperaturama nižima od -120℃ u električnim zamrzivačima ili u plinovitoj fazi dušika. Na višim temperaturama postoji mogućnost rasta kristala leda zbog tzv. procesa rekristalizacije u kojem voda migrira iz manjih kristala u veće.

Zbog zadržavanja što niže temperature u spremnicima, kao i zbog sprječavanja oscilacija temperature, mnogi laboratoriji pohranjuju KMS u tekućem dušiku. Bitno je naglasiti da pri ovakvom načinu čuvanja postoji mogućnost da se putem tekućeg dušika prenesu uzročnici zaraznih bolesti jednog presatka na drugi. Ovu stavku potkrjepljuje i slučaj zaraze triju bolesnika hepatitisom B nakon transplantacije zbog križne kontaminacije presatka čuvanih u istome spremniku. Zbog navedenoga, presadci čuvani u tekućem dušiku moraju biti dodatno zaštićeni u dodatnim vrećicama. Naime, ovisno o nalazu biljega krvlju prenosivih bolesti presadak KMS-a se pohranjuje u jedan od spremnika za presatke s tekućim dušikom. Ako je nalaz biljega negativan presadak se pohranjuje u sterilni spremnik, a ukoliko je pozitivan pohranjuje se u spremnik za presatke sa pozitivnim biljezima. Čuvanje presadaka u plinovitoj fazi dušika smanjuje rizik križne kontaminacije. No, u ovakvim spremnicima postoji razlika u temperaturi ovisno o položaju.

Neke krioprotektivne otopine dopuštaju pohranu KMS-a na višim temperaturama, npr. na -80℃. S obzirom na to da je -80℃ radna temperatura električnih

zamrzivača koji se često upotrebljavaju u laboratorijima, jedan dio transplantacijskog centra koristi se takvim zamrzivačima za pohranu KMS-a. Međutim, u takvim zamrzivačima KMS mogu sigurno biti pohranjene tek nekoliko mjeseci od sakupljanja. [5]

Danas se smatra da tehnika kontroliranog zamrzavanja stanica i njihovo uskladištenje u tekućem dušiku na -196°C omogućuje da stanice ostanu žive godinama te se ponovno razmnože u koštanoj srži nakon odmrzavanja. Naime, metoda krioprezervacije (očuvanje dubokim zamrzavanjem) omogućuje da izvorne osobine biološkog materijala ostanu nepromijenjene što je moguće više, kao i količina živih stanica [10]

Slika 8. Prikazuje sustav s kontroliranom brzinom zamrzavanja živih bioloških uzoraka (stanice, tkiva) do kriogenih temperatura (do -196 ℃). Cijeli postupak zamrzavanja je pod računalnom kontrolom, nadzire ga glavni računalo tipa CPR i kontrolira koprocesor CST05. [19]



Slika 8. Biofreeze BV 40 [19]

Zamrzavanje stanica je ujedno i posljednji korak u procesu pripreme pripravaka krvotvornih matičnih stanica. Korak koji slijedi iza je izdavanje tih pripravaka po potrebi. Obavezan postupak prije izdavanja KMS-a u transplantacijski centar je provjera zadovoljava li pripravak sve zahtjeve kvalitete. Pregledava se izgled pripravka (cjelovitost pakiranja, oznaka, promjena boje), a rezultati proizvedenog postupka još se jednom provjere. S obzirom na to da je pripravak KMS-a namijenjen isključivo za

liječenje određenog bolesnika, mora postojati sustav identifikacije koji nedvojbeno povezuje pripravak i bolesnika. Ukoliko se otkriju nepravilnosti i odstupanja, obavještava se bolesnikov liječnik i transplantacijski tim koji donose odluku o daljnjem liječenju bolesnika.

Neposredno prije izdavanja staničnog pripravka iz banke ili neposredno prije primjene, uz bolesnikov krevet potrebno je učiniti dodatne postupke koji su dio proizvodnog procesa, a to uključuje otapanje koje se provodi u vodenoj kupelji s fiziološkom otopinom, pranje, eventualno uzimanje uzoraka. Bitno je da prostor u kojem se ove manipulacije izvode mora zadovoljiti mikrobiološku sigurnost. Tek nakon što je pripravak provjeren i proglašen valjanim može se refundirati. [5]

3.7. Dobra prerađivačka praksa i akreditacija

Akreditacija je potvrđivanje koje provodi treća strana (U Republici Hrvatskoj je to HAA – Hrvatska Akreditacijska Agencija.), a odnosi se na tijelo za ocjenjivanje sukladnosti (laboratorij, certifikacijsko ili inspekcijsko tijelo), dajući formalan iskaz njegove osobljenosti za obavljanje određenih zadataka ocjenjivanja sukladnosti odnosno ispitivanja, umjeravanja, certifikacije, te inspekcije. [20]

Svi postupci modifikacije staničnog pripravka, od početka proizvodnje do primjene, dio su proizvodnoga procesa. Oni moraju biti trajno nadzirani i dokumentirani. Ustanove koje se bave proizvodnjom staničnih pripravaka trebaju raditi prema zahtjevima dobre prerađivačke prakse i postojećim zakonskim propisima koji reguliraju rad tkivnih i staničnih banaka.

4. REZULTATI

4.1. Klinički rezultati autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica

ATKS je danas standardan pristup liječenju bolesnika s akutnim mijeloičnim (AML) i akutnim limfoblastičnim leukemijama (ALL) u prvoj kompletnoj remisiji (KR) bolesti, a u odabranim grupama bolesnika s inače povoljnijom prognozom (dječja ALL, promijelocitna leukemija) u drugoj remisiji bolesti. ATKS je u većini retrospektivnih, ali i u prospektivnim randomiziranim studijama (premda ne svim) pokazala bolje rezultate u usporedbi s konvencionalnom konsolidacijskom kemoterapijom.

Tablica 4.2. a) Rezultati liječenja akutnih leukemija ATKS-om

Liječenje akutnih leukemija ATKS-om	Uspješnost liječenja
U I. kompletnoj remisiji akutne leukemije	40% - 50% dugotrajno preživljenje
U II. kompletnoj remisiji akutne leukemije	< 40%

Tablica 4.2. b) Rezultati liječenja Hodgkinove bolesti i non-Hodgkin limfoma ATKS-om

Oboljenje	Rezultat
Hodgkinova bolest u relapsu, te u fazi gdje je bolest primarno refraktorna na terapiju	30% - 60% dugotrajno preživljenje
Non-Hodgkin limfom u relapsu, ali s još kemosenzitivnom bolešću	50% dugotrajna remisija bolesti nakon transplantacije

U multiplom mijelomu, bolesti koja je inače neizlječiva konvencionalnom terapijom, dosadašnji rezultati liječenja ATKS-a, premda ne upućuju na sigurnu mogućnost izlječenja, znatno su bolji od rezultata konvencionalnog liječenja u pogledu preživljavanja i dužine života bez znakova bolesti.

Jedna novija, još uvijek eksperimentalna indikacija za liječenje transplantacijom matičnih matičnih hematopoeznih stanica su autoimune bolesti. Načelo liječenja temelji se na mogućnosti da se bolesni autoagresivni imunosni sustav uništi ili jako suprimira, te se presađivanjem imunohematopoeznog sustava zdravog srodnika (alloTKS) ili vlastitog (autoTKS), eventualno *in vitro* „čišćenog" sustava, uspostavi zdravi imunosni sustav, odnosno ponovno postigne tolerancija na vlastite antigene. [6]

Transplantacija autolognih matičnih hematopoeznih stanica nakon primjene visokih doza kemo(radio)terapije nedvojbeno je alternativno liječenje za bolesnike koji se zbog ograničenja (npr. nepostojanje prikladnog davatelja, viša životna dob) ne mogu liječiti alloTKS-om. Jednostavnijom tehnikom mobiliziranja i sakupljanja, odnosno *in vitro* ekspanzije matičnih stanica za transplantaciju, širi se indikacijsko područje, način i učestalost primjene ATKS-a (npr. multiple transplantacije). Najnovije metode *ex vivo* separacije i ekspanzije pojedinih vrsta hematopoeznih stanica, od matičnih CD34 stanica do pojedinih subpopulacija limfocita i dendritičnih stanica za imunoterapiju, uvod su u novu epohu manipuliranja imunohematopoeznim tkivom za transplantaciju i/ili imunoterapiju, te u širu primjenu genske terapije. [6]

4.2. Neželjene reakcije povezane s prikupljanjem i transplantacijom krvotvornih matičnih stanica

Osim prethodno navedenih pozitivnih ishoda transplantacije te svega onoga korisnoga što taj postupak omogućuje pacijentu, ne smiju se izostaviti i mogući negativni krajnji rezultati koji mogu nastati zbog različitih čimbenika na koje se moglo ili nije moglo utjecati.

Premda je prikupljanje KMS iz periferne krvi siguran postupak, ipak se može očekivati pojava neželjenih reakcija, od poremećaja elektrolita zbog primjene citrata, pa do povećanog rizika od krvarenja zbog smanjenja broja trombocita i primjene heparina.

Tablica 4.3. a) Poremećaj kalcija kao neželjeni rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Hipokalcemija	
Razlog nastanka	Citrat veže ionizirani kalcij prilikom vraćanja citratne krvi u postupku leukafereze
Incidencija	39% - 48%
Simptomi	Parestezije, glavobolja, mučnina, mogući i morbiditet, kod djece mogući nemir, tahikardija i hipotenzija
Profilaksa	Infuzija kalcija
Rezultati profilakse	Smanjenje simptoma hipokalcemije u 65% - 90% slučajeva

Tablica 4.3. b) Poremećaj magnezija kao neželjeni rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Hipomagnezijemija	
Razlog nastanka	Stvaranje kompleksa Mg - citrat

Tablica 4.3. c) Poremećaj kalija kao neželjeni rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Hipokalijemija	
Razlog nastanka	Pomak kalija iz ekstracelularne u intracelularnu tekućinu, a jedan od činitelja koji uzrokuje taj pomak je alkaloza (Tijekom leukafereze dolazi do značajnog porasta pH krvi i suviška baza, što objašnjava popratno sniženje vrijednosti kalija)
Nadoknada kalija	Peroralno uzimanje kalija

Tablica 4.3. d) Poremećaj trombocita kao neželjeni rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Smanjenje broja trombocita	
Razlog nastanka	Stanični separator uz mononuklearne stanice uvijek prikuplja i dio stanica iz sloja trombocita
Incidencija	Ovisno o volumenu obrađene krvi broj trombocita se nakon leukafereze obično smanjuje za 40 do 50%.

Tablica 4.3. e) Poremećaj eritrocita kao neželjenji rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Gubitak eritrocita	
Razlog nastanka	Nastaje kad se na kraju postupka zbog tehničkih problema sa staničnim separatorom ne može isprati i vratiti krv iz separatora
Incidencija	Izuzetno rijetko

Tablica 4.3. f) Poremećaj tjelesne temperature kao negativni rezultat prikupljanja KMS-a [8]

Hipotermija	
Razlog nastanka	Hlađenja krvi tijekom prolaska kroz cijevi staničnog separatora i infuzije otopina koje su sobne temperature
Metabolički poremećaj koje pospješuje	Hipokalcemija
Sprječavanje	Primjena grijača za krv

Tablica 4.3. g) Ostale neželjene reakcije povezane s prikupljnjem KMS iz periferne krvi [8]

Vrsta reakcije	Posljedica rekacije
Neželjene reakcije povezane s mobilizacijom KMS	Bol u kostima, glavobolja, mialgije, artralgije, bolovi u prsima, umor, povećanje ili ruptura slezene, povišena tjelesna temperatura
Neželjene reakcije povezane s venskim pristupom	Hematom, odgođeno krvarenje, iritacija živca, oštećenje živca, oštećenje tetive, bol u ruci, tromboflebitis, lokalna alergijska reakcija
Generalizirani simptomi	Vazovagalna reakcija (trenutna, trenutna s ozljedom, odgođena, odgođena s ozljedom)
Ostale neželjene reakcije povezane s leukaferezom	Tosičnost citrata, hemoliza, generalizirana alergijska reakcija, zračna embolija

Osim prethodno navedenih neželjenih reakcija vezanih uz prikupljanje krvotvornih matičnih stanica, takve reakcije su moguće i kao krajnji rezultat autotransplantacije.

Tablica 4.3. h) Neželjene reakcije vezane za transplantaciju KMS-a [6]

	Autologna transplantacija
Neželjene pojave	Bakterijske i gljivične infekcije Virusne infekcije Krvarenja u fazi trombocitopenije Oštećenje sluznica probavnog trakta (mukozirtis) Venookluzivna jetrena bolest

5. ZAKLJUČCI

Priprema pripravaka krvotvornih matičnih stanica od njihovog prikupljanja pa sve do njihove obrade u laboratoriju je učinkovit i siguran postupak kojim je omogućeno liječenje hematoloških oboljenja. Na osnovu svega prethodno napisanog može se zaključiti sljedeće:

1. Zbog sposobnosti proliferacije, samoobnavljanja, diferencijacije i maturacije KMS se već više od 25 godina uspješno primjenjuju u autolognoj transplantaciji za liječenje kongenitalnih i stečenih malignih bolesti krvotvornog i imunosnog sustava, kao i nekih solidnih tumora.

2. Tradicionalni izvor KMS je koštana srž koja danas sve više ustupa mjesto transplantatu prikupljenom iz periferne krvi. Prikupljanje KMS iz periferne krvi postupkom leukafereze na staničnom separatoru je jednostavnije i sigurnije nego prikupljanje koštane srži.

3. Broj leukafereza koji je potreban za prikupljanje ciljnog broja stanica ovisi o stupnju mobilizacije KMS u perifernu krv, pravodobnom početku prikupljanja, kao i tehnici prikupljanja. Primjena učinkovite tehnike prikupljanja je važna jer utječe direktno na sveukupni broj CD34+ stanica u produktu, a time smanjuje broj potrebnih leukafereza, razdoblje primjene citokina i troškove prikupljanja.

4. Nakon završenog postupka leukafereze uvijek se analizira kvaliteta prikupljenih stanica.

5. Učinkovitost pripravka mjeri se brzinom hematološkog oporavka. Transplantacija KMS omogućila je velikom broju pacijenata, ovisno o individulanim čimbenicima njihova oboljenja, potpuno izlječenja ili dugotrajno preživljavanje. Danas se napori ulažu da postotak potpunog oporavka bude što veći.

6. LITERATURA

1. Bojanić I., Sakupljanje krvotvornih matičnih stanica iz krvi postupkom leukafereze velikog volumena krvi (disertacija). Zagreb, Hrvatska: Medicinski fakultet; 2009, str. 6-54.

2. Koštana srž, URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Ko%C5%A1tana_sr%C5%BE (21.06.2015.)

3. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throught life. Cell 2008;132:598-611.

4. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol 2006;169:338-46.

5. Seratić J. i sr. Klinička kemija i molekularna dijagnostika: Laboratorijski aspekti transplantacije krvotvornih matičnih stanica. 1. izd.: Medicinska naklada; 2008;19:218-224.

6. Labar B., Hauptmann E. i sr. Hematologija: Transplantacija hematopoeznih matičnih stanica. 4. izd.: Školska knjiga; 2007;19:326-336.

7. Baričević M., Učestalost neželjenih reakcija tijekom prikupljanja krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi (diplomski rad). Zagreb, Hrvatska: Medicinski fakultet: Sveučilišni diplomski studij sestrinstva; 2013, str. 9-28

8. Bojanić I., Maziž S. Golubić Ćepulić B., Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi. Zagreb, Hrvatska: Zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju KBC Zagreb; 2009, str. 1-8.

9. Serventi-Seiwerth R., Mikulic M., Mrsić M. i sur., Transplantacija alogenih matičnih stanica od HLA podudarnog nesrodnog davatelja. Zagreb, Hrvatska: Zavod za

hematologiju: Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb, Laboratorij za HLA tipizaciju, KBC Zagreb, Zavod za transfuziju, KBC Zagreb; 2011, str. 381-387.

10. Pulanić D., Tisuću transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica KBC-a Zagreb. Medix-Specijalizirani medicinski dvomjesečnik; 2009, velj.

11. Banka krvi iz pupkovine Ana Rukavina, Obavještajni pristanak; KBC Zagreb

12. Roditelji hr., URL: http://www.roditelji.hr/obitelj/1014-saznajte-sve-o-krvi-iz-pupkovine-i-maticnim-stanicama/ (07.06.2015.)

13. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 1. i 3. iz., New York: Alan R. Liss, Inc., 1988.

14. Batinić D. Laboratorijska dijagnostika imunodeficijencijskih sindroma. Paediatr Croat 2005;49:39-47.

15. Batinić D., Rnjak L., Dubravčić K., Protočna citometrija u hematologiji. Paediatr Croat 2006;50:176-182.

16. Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral clood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cell. Blood 1990;76.

17. Brenner MK, Rill DR, Moen RC i sur. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. Lancent 1993;341:85-86.

18. Moss TJ, Ross AA. The risk of tumor cell conttamination in periphera blood stem cell collections. J Hematother 1992;1:225-232.

19. ISSUU – BioFreeze, URL: http://issuu.com/kriorus/docs/bv40_20100121183819 (07.06.2015.)

20. HAA, URL: http://www.akreditacija.hr/ (08.06.2015.)

7. SAŽETAK

Uvod

Funkcionalno sposobne i zrele krvne stanice nastaju od zajedničke krvotvorne matične stanice u koštanoj srž. Aktivacijom određenih gena te međudjelovanjem krvotvornih činitelja rasta krvotvorne matične stanice (KMS) imaju sposobnost proliferacije (staničnog rasta, tj. diobe) i samoobnavljanja, diferencijacije (usmjeravanja) u pojedinu staničnu liniju tj. lozu i maturacije (sazrijevanja) duž određene stanične linije, od nezrelih do funkcionalno aktivnih, zrelih stanica. Upravo zbog navedenih svojstava koje posjeduju, krvotvorne matične stanice danas su nezaobilazna metoda liječenja oboljenja krvotvornog sustava.

Cilj

Cilj ovoga rada je prikazati i objasniti zadaće neizostavne komponente u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica, a to je laboratorij.

Izvori podataka i metode

Za liječenje bolesnika KMS se prikupljaju iz koštane srži, periferne krvi i krvi iz pupkovine, a mogu se uzeti od bolesnika (autologne KMS) ili od druge osobe (alogenične KMS, srodne i nesrodne). Matične stanice za autolognu transplantaciju uzimaju se putem staničnih separatora u postupku leukafereze. Da bi nakon presadbe pripravak krvotvornih matičnih stanica dugotrajno obnovio funkciju koštane srži pripravak, dobiven u postupku leukafereze, potrebno je laboratorijski obraditi. Postupci obrade pripravaka KMS-a dijele se na rutinske i specijalizirane. Osim navedenoga, potrebno je provesti i kontrolu kvalitete pripravaka KMS-a koja uključuje: provjeru broja i vrste stanica, imunofenotipizaciju KMS-a, procjenjivanje vijabilnosti stanica, postupak kratkotrajne kulture KMS-a, mikrobiološko testiranje te analizu kontaminacije

tumorskim stanicama.. Nakon uspješno provedenih prethodnih postupaka KMS se pohranjuju u tekućem dušiku na temperaturi -196℃.

Rezultati

Transplantacija KMS-a omogućila je velikom broju pacijenata, ovisno o individulanim čimbenicima njihova oboljenja, potpuno izlječenja ili dugotrajno preživljavanje. S druge strane, osim tih pozitivnih ishoda kao krajnji rezultat se mogu pojaviti i neke komplikacije povezane ili s prikupljenjem ili transplantacijom KMS poput: hipokalcemije, hipomagnezijemije, hipokalijemije, sniženog broja trombocita, eritrocita, hipotermije, infekcije i dr.

Zaključak

Prikupljanje KMS iz periferne krvi postupkom leukafereze, a zatim laboratorijska obrada istih, je jednostavnija i sigurnija metoda od prikupljanja koštane srži. Zbog svoje mnogostruke prednosti autologna transplantacija KMS se već preko 25 godina koristi kao metoda liječenja hematoloških i imunoloških oboljenja.

8. SUMMARY

Introduction

Functionally capable and mature blood cells derive from a haematopietic stem cell in the bone marrow. By activating certain genes and by interaction of blood growth factors haematopoietic stem cells (HSC) have the capability of proliferating (cell growth, division) and regenerating, differentiating into a certain blood line and maturing along a specific blood line, from an immature to a functionally active, mature cell. It is because of these capabilities that blood stem cells are today an unavoidable method of curing blood diseases.

Objective

The purpose of this paper is to show and explain the tasks of an infallible component in blood stem cells transplantation, which is a laboratory.

Data sources and methods

To treat a patient, haematopoietic stem cells are collected from the bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood, and they can be taken from the patient (autologuous blood stem cells) or from another person (allogeneic blood stem cells, related and non related). Stem cells for autologous transplantation are taken via blood separators in the process of leukapheresis. To renew the function of the bone marrow in long-term meaning, haematopoietic stem cells obtained in the process of leukapheresis need to be processed in a laboratory. The process of HSC treatment is divided into a routine and specialized process. It is also necessary to do a quality control check of the HSC which includes: checking the number and type of cell, immunophenotypization of HSC, assesing the viability of the cells, procedure of short term HSC culture, microbiological testing and the analysis of tumor cell contamination. After all of these procedures are successfully finished, HSC are stored in liquid nitrogen on the temperature of -196℃.

Results

HSC transplantation has enabled for a lot of patients, depending on individual factors of their disease, complete healing or long term survival. On the other hand, besides these positive outcomes as an end result certain complications linked to either collection or transplantation of HSC can appear, such as: hypocalcemia, hypomagnesemia, hypokalemia, low thrombocyte and erythrocyte number, hypothermia, infections etc.

Conclusion

Collecting HSC from the peripheral blood in the process of leukapheresis, and their following laboratory treatment is a more simple and safer method than collecting bone marrow. Due to its multiple advantages autologuous HSC transplantation has been used for over 25 years as a method of treating haematological and immunological diseases.

9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Jozefina Marinčić

Datum i mjesto rođenja: 17.11.1993., Tomislavgrad, Bosna i Hercegovina

Adresa: Branimirova bb, Tomislavgrad, Bosna i Hercegovina

Telefon: 0038734/ 353 572

Mobitel: Hrvatska: 0038597/7822173; Bosna i Hercegovina: 0038763/822174

E-mail adresa: marincic.jozefina@gmail.com

OBRAZOVANJE

Osnovno obrazovanje: 2000. – 2008. Osnovna škola Ivana Mažuranića, Tomislavgrad

2001. – 2008. Osnovna glazbena škola Tomislavgrad, smjer klavir

Srednjoškolsko obrazovanje: 2008. – 2012. Opća gimnazija Marka Marulića, Tomislavgrad

Datum upisa na Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika: 19.07.2012.

Jezici: engleski jezik, osnovna razina njemačkog jezika

Računalne vještine: dobro poznavanje Microsoft Office paketa

OSTALO

Dugogodišnji član Franjevačke mladeži (Frama)

Bavljenje volonterskim radom

Položen vozački ispit