

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martina IFKO

**PREŽIVETJE ČLOVEŠKIH MATIČNIH CELIC V
VZORCU SHRANJENE POPKOVNIČNE KRVI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Martina IFKO

**PREŽIVETJE ČLOVEŠKIH MATIČNIH CELIC V VZORCU
SHRANJENE POPKOVNIČNE KRVI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SURVIVAL OF HUMAN STEM CELLS IN SAMPLE OF SAVED
UMBILICAL CORD BLOOD**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za citometrijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana, dr. med., za somentorico dr. Andrejo Natašo Kopitar, univ. dipl. biol., in za recenzenta prof. dr. Vladimirja Kotnika, dr. med.

Mentor: prof. dr. Alojz IHAN, dr. med.

Somentorica: dr. Andreja Nataša KOPITAR, univ. dipl. biol.

Recenzent: prof. dr. Vladimir KOTNIK, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Vladimir KOTNIK, dr. med., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN, dr. med., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: dr. Andreja Nataša KOPITAR, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martina IFKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 602.9:611.018:618.48:57.086.8(043)=163.6
 KG matične celice/popkovnična kri/citometrija/pretočni citometer/metoda ISHAGE/
 preživetje matičnih celic/shranjevanje matičnih celic/CD34+
 AV IFKO, Martina
 SA IHAN, Alojz (mentor) / KOPITAR, Andreja Nataša (somentorica) / KOTNIK
 Vladimir (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije
 LI 2011
 IN PREŽIVETJE ČLOVEŠKIH MATIČNIH CELIC V VZORCU SHRANJENE
 POPKOVNIČNE KRVI
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP IX, 58 str., 9 pregl., 15 sl., 52 vir.
 IJ sl
 JI sl/en

AI V zadnjih letih je v porastu shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi, in sicer tako za nesorodno kot tudi sorodno presaditev. Popkovnična kri je bogat vir krvotvornih matičnih celic, ki se po presaditvi naselijo v kostnem mozgu in tvorijo krvne celice. Namen diplomske naloge je ugotoviti, kako čas vpliva na viabilnost matičnih celic v vzorcu in določitev CD34+ celic v popkovnični krvi, zato da se določi, ali je popkovnična kri primerna za nadaljnje shranjevanje. Zanimalo nas je tudi, kakšna je najnižja koncentracija monoklonskih protiteles CD34, CD45, s katero lahko še zanesljivo označimo vse matične celice (CD34+) v vzorcu. Za našo raziskavo smo uporabili vzorce popkovnične krvi, namenjene za potencialno avtologno uporabo, shranjene v zasebni banki. Analizo CD34+ celic smo opravili s pretočnim citometrom. Za delo smo uporabili ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) metodo, ki je validirana, preprosta, hitra in visoko občutljiva metoda za kvantifikacijo CD34+ celic. Ugotovili smo, da je najprimernejše razmerje med volumnom preiskovane krvi in dodanimi protitelesi 10 : 2, dokazali smo tudi, da je metoda primerna za klinično uporabo, saj nam da zanesljive rezultate, kajti odstopanje v rezultatih pri izvajanju meritev v paralelkah je manjše kot 5 %. Nasprotno od pričakovanega pa smo ugotovili, da število živih CD34+ celic s časom ne pada konstantno, ampak pri nekaterih vzorcih sčasoma celo naraste, na kar vpliva dejstvo, da je levkocitna populacija različno občutljiva in ima različno življenjsko dobo. Ker je matičnih celic v popkovnični krvi manj kot 1 %, je takšno odstopanje od rezultatov vidno, vendar je zanemarljivo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 602.9:611.018:618.48:57.086.8(043)=163.6

CX stem cells/cord blood/cytometry/flow cytometer/ISHAGE method/survival of stem cells/storage of stem cells/CD34+

AU IFKO, Martina

AA IHAN, Alojz (supervisor) / KOPITAR, Andreja Nataša (co-advisor) / KOTNIK, Vladimir (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2011

TI SURVIVAL OF HUMAN STEM CELLS IN SAMPLE OF SAVED UMBILICAL CORD BLOOD

DT Graduation thesis (University studies)

NO IX, 58 p., 9 tab., 15 fig., 52 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In the last years preserving of stem cells from umbilical cord blood for unrelated and related transplantation has increased. Umbilical cord blood is a rich source of hematopoietic stem cells. After the transplant they are found in bone marrow where they form blood cells. The purpose of this graduation thesis was to find out, how the viability of stem cells in a sample is influenced by time. We also wanted to define CD34+ cells in umbilical cord blood to find out if umbilical cord blood is suitable for further preserving. The purpose of the research was also to define the lowest concentration of monoclonal antibodies CD34 and CD45, with which we can indicate all stem cells (CD34+) in the sample. We have used samples of umbilical cord blood, designed for potential autologous use and preserved in a private cord blood bank. CD34+ have been analysed with flow cytometer. We used ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) method, which is a validated, simple, fast and highly sensitive method for quantification of CD34+ cells. It has been found out that the best ratio between volume of examined blood and added antibodies is 10 : 2. We also proved that this method is suitable for clinical use, because it gives us reliable results, deviation in the results when performing the duplicates is lower than 5 %. Unlike expected we found out that number of viable CD34+ cells is not decreasing constantly in time but in some samples it even increases in time. This is because leukocyte population have different sensitivity and different period of life. Since there are less than 1 % of stem cells in umbilical cord blood such deviation from results is visible, however, it is negligible.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 VRSTE MATIČNIH CELIC	5
2.1.1 Vrste matičnih celic glede na izvor	5
2.1.2 Vrste matičnih celic glede na vrsto	7
2.2 UPORABA POPKOVNIČNIH MATIČNIH CELIC	8
2.2.1 Potencialna uporaba matičnih celic iz popkovnične krvi	8
2.2.2 Dejanska uporaba matičnih celic iz popkovnične krvi	11
2.2.2.1 Prva uporaba	11
2.2.2.2 Trenutna klinična uporaba	12
2.3 ODVZEM POPKOVNIČNE KRVI	20
2.4 SHRANJEVANJE POPKOVNIČNE KRVI	22
2.4.1 Odmrzovanje enot krvi po shranjevanju v tekočem vodiku	24
2.5 Vpliv raznih dejavnikov na količino popkovnične krvi in število celic v njej	24
2.5.1 Materine lastnosti, ki vplivajo na količino popkovnične krvi in število celic v njej	24
2.5.2 Neonatalni dejavniki, ki vplivajo na količino popkovnične krvi in število celic v njej	26

2.6 CD34 IN CD45	27
2.6.1 Metode za štetje celic CD34+	28
2.6.1.1 ISHAGE	29
3 MATERIALI IN METODE	31
3.1 PRIPRAVA POPKOVNIČNE KRVI ZA ANALIZO NA PRETOČNEM CITOMETRU	31
3.2 ANALIZA CELIC CD34+ S PRETOČNIM CITOMETROM	32
3.3 UPORABLJENI REAGENTI	38
3.3.1 CD45/CD34	38
3.3.2 7AAD	38
3.4 UPORABLJENI VZORCI KRVI	39
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA	40
4 REZULTATI	41
4.1 KONCENTRACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES	41
4.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV	42
4.2.1 Ponovljivost rezultatov po metodi A in B	42
4.2.2 Ponovljivost metode A	44
4.3. VPLIV STAROSTI KRVI NA MERJENE PARAMETRE	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1 KONCENTRACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES	48
5.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV	49
5.3 VPLIV ČASA NA MERJENE PARAMETRE	49
6 POVZETEK	51
7 VIRI	52
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot standardna terapija (Verter, 2011)	13
Preglednica 2: Bolezni, za katere je zdravljenje z matičnimi celicami iz popkovnične krvi v fazi kliničnih testiranj (Verter, 2011)	16
Preglednica 3: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot eksperimentalno zdravilo (Verter, 2011).....	17
Preglednica 4: Ponovljivost rezultatov po metodi A	42
Preglednica 5: Ponovljivost rezultatov po metodi B	43
Preglednica 6: Ponovljivost metode A	44
Preglednica 7: Rezultati ponovljivosti po metodi A.....	45
Preglednica 8: Vpliv starosti krvi na merjene parametre	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Diferenciacija matičnih celic (Winslow in Duckwall, 2001: 2).....	2
Slika 2: Mezenhimske matične celice (Rožman in sod., 2007: 208).....	8
Slika 3: Epruveta BD TruCount (Becton Dickinson, 2008: 1).....	30
Slika 4: Pretočni citometer (citometer, voziček s tekočinami in računalnik z LCD-monitorjem) (Becton Dickinson, 2005: 10).....	32
Slika 5: Shematični prikaz pretočnega citometra FACS Calibur (Ihan, 1999:12)	34
Slika 6: Zamejitev levkocitov.....	35
Slika 7: Ločitev živih levkocitov od mrtvih	35
Slika 8: Prikaz vseh živih levkocitov	36
Slika 9: Prikaz števila živih celic CD34+.....	36
Slika 10: Absolutno število celic v vzorcu ($P=x$).....	37
Slika 11: Odstotek mrtvih celic CD34+ prikazan desno spodaj.....	37
Slika 12: Kemijska struktura 7AAD (Merck, 2011: 2)	39
Slika 13: Rezultati meritev za metodo A, B in C	41
Slika 14: Povprečno razmerje in standardna napaka med številom živih celic CD34+, merjenih 1. dan, in številom živih celic, izmerjenih 3. in 5. dan.....	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

7AAD	amino actinomicin D
CD	Cluster of Differentiation
CD34	glikoliziran polipeptid, ki se nahaja na hematopoetskih zarodnih celicah in na endotelijskih progenitornih celicah
CD34+	absolutno število zarodnih celic
CD45	transmembranski glikoprotein s tirozin fosfatazno aktivnostjo, ki se nahaja na vseh levkocitih
CDP	citrat fosfat deksstroza
DMSO	dimetil sulfoxid
DNK	dioksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
EMC	embrionalne matične celice
FITC	fluorescein-izo-tiocianat
GVHD	Graft-versus-host disease; reakcija presadka proti prejemniku
HLA	humani levkocitni antigeni
HPCA	human progenitor cell antigen
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
kD	kilo Dalton
KMC	krvotvorne matične celice
MC	matične celice
MHC	poglavitni histokompatibilnosti kompleks
PE	fikoeritrin
v/v	volumenski/ volumen

1 UVOD

Matične celice (MC, angl. stem cells) so nediferencirane celice embria, zarodka ali odraslega, ki imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja, samoobnavljanja in diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Gre za maloštevilno populacijo nespecializiranih celic. Po obliki so podobne majhnim limfocitom. Nahajajo se v vseh tkivih odraslega človeka in nadomeščajo odmrle ali poškodovane celice. Omogočajo torej, da se naša tkiva in organi regenerirajo kljub številnim poškodbam in okvaram. Njihova plastičnost jim omogoča, da se lahko razvijejo v več kot 200 različnih vrst celic (Levičar in sod., 2009).

Matične celice lahko osamimo iz zarodka na stopnji morule in blastocite, iz popkovnične krvi, iz posteljice in iz kostnega mozga odraslega človeka (Rožman in sod., 2007).

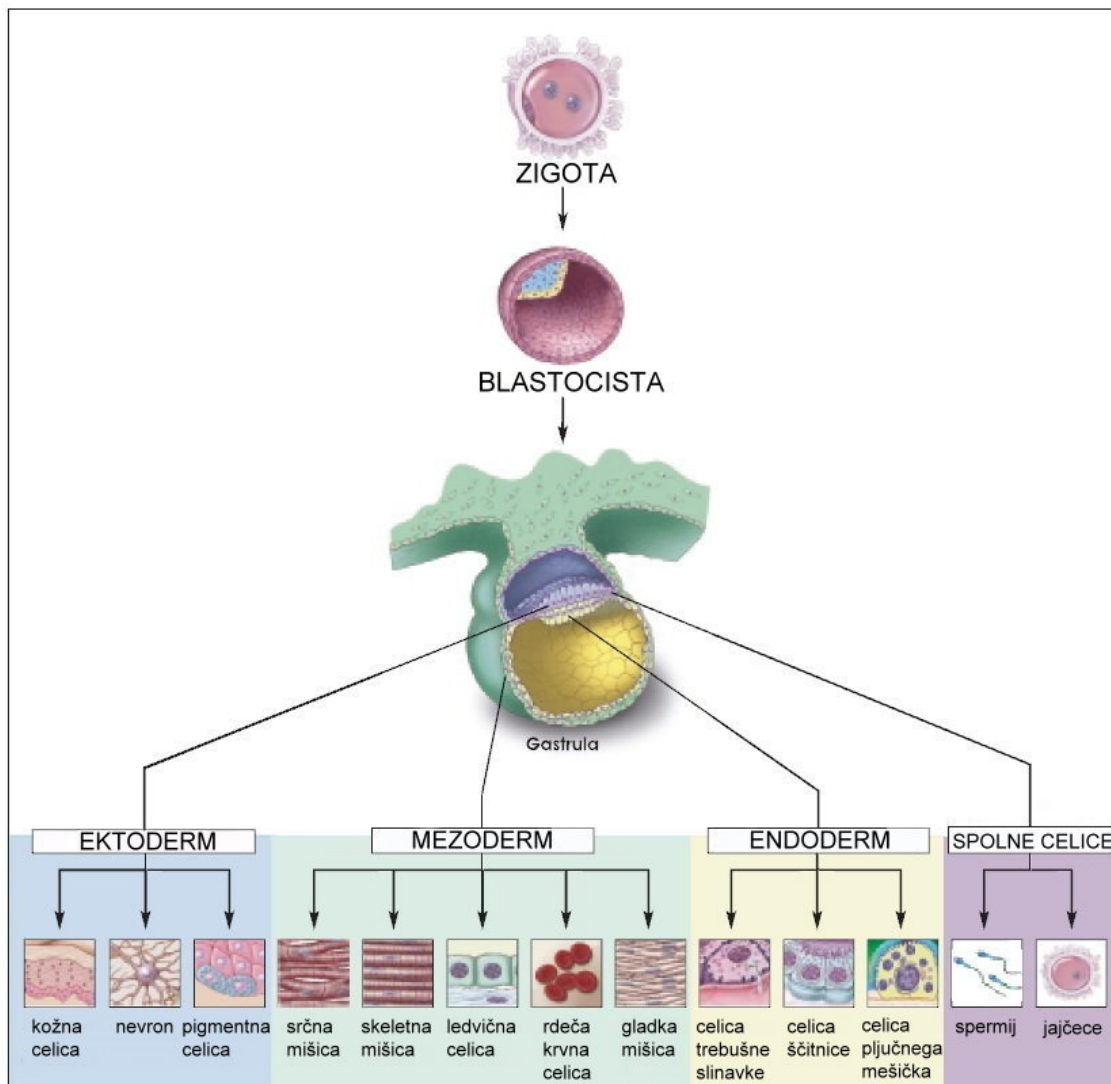
Matične celice so izredno plastične, kar pomeni da imajo izredno prilagoditveno sposobnost na spremembe, saj če matične celice iz naravnega okolja presadimo v novo mikrookolje, pridobijo lastnosti, ki ustrezajo novemu okolju. Plastičnost pomeni, da so matične celice poleg samoobnavljanja, proliferacije in diferenciacije sposobne pridobiti tudi fenotip celic iz drugega tkiva. V določenih primerih so matične celice celo sposobne preskočiti iz ene somatske linije v drugo (npr. iz mezoderma v endoderm).

Plastičnost oz. spremenljivost matičnih celic je osupljiva in kaže, da je sestavljena iz štirih elementov (Rožman in sod., 2007):

- iz sposobnosti za dediferenciacijo, tj. za razvoj odrasle ali linijsko usmerjene celice prednice v bolj primitivne oblike,
- iz sposobnosti za transdeterminacijo; tj. preskoka v drugo predniško celično linijo,
- iz sposobnosti za transdiferenciacijo, tj. sposobnosti, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice,
- ter iz sposobnosti za fuzijo z drugimi, že diferenciranimi celicami v tkivu, iz česar nastane popolnoma nova celična vrsta.

Po sposobnosti diferenciacije jih delimo na: totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne. Totipotentne celice so se sposobne diferencirati v vse celične vrste, vključno s spolnimi celicami, in nastanejo takoj ob oploditvi. Pluripotentne celice se lahko

diferencirajo v vse tri celične plasti: mezoderm, ektoderm in endoderm. Niso pa se sposobne diferencirati v trofoblast – del blastociste, ki se ugnezdi v steno maternice in se kasneje razvije v posteljico. Unipotentne matične celice se lahko diferencirajo le v eno celično vrsto, multipotentne pa se lahko razvijejo v različne celične tipe, vendar so omejene na tipe znotraj svoje zarodne plasti. Imenujemo jih tudi celice prednice (progenitorji) (Rožman in sod., 2007).



Slika 1: Diferenciacija matičnih celic (Winslow in Duckwall, 2001: 2)

Vse krvne celice izvirajo iz pluripotentnih matičnih celic. Nahajajo se na različnih krajih hematopoeze. Med življenjem osebkov se ti kraji spreminjajo. Pri človeku vse krvne celice

nastajajo v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu. Krvotvorni in hematopoetski tkivi sta kostni mozeg in limfatično tkivo. Eritrociti, monociti, granulociti in megakariociti nastajajo pri zdravem človeku samo v kostnem mozgu, v katerem nastajajo tudi limfociti (Andoljšek, 2005).

Osnovna matična celica je pluripotentna. Z delitvijo se obnavlja in dozoreva v multipotentno. Hemstopoeza se začne v rumenjaku v 60. danu, nato se prenese v plodova jetra (v 50–150 dneh) in nekje po 79 dneh se prenese v kostni mozeg (Vozelj, 2000). Zgodaj v hematopoezi se pluripotentna matična celica diferencira v dve smeri: v multipotentno matično celico mieloične vrste in v multipotentno matično celico limfatične vrste. Obe sta sposobni samoobnove in dozorevanja v usmerjene matične celice. Multipotentna matična celica mieloične vrste dozoreva v usmerjeno matično celico granulocitno monocitne, eritroblastne in megakariocitno-trombocitne vrste. Iz usmerjene matične celice granulocitno monocitne vrste nastanejo eritrociti. Iz usmerjene matične celice megakariocitno-trombocitne vrste nastanejo z dozorevanjem megakariociti in iz teh trombociti. Iz usmerjene matične celice granulocitno-monocitne vrste z dozorevanjem nastanejo: nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci in monociti. Nastajanje novih in nadomeščanje propadlih krvnih celic je natančno uravnano.

Iz multipotentne matične celice limfatične vrste se v limfatičnem tkivu oziroma kostnem mozgu razvijejo limfociti vrste B in vrste T. V končni fazi se limfociti B preobrazijo v plazmatke.

Kostni mozeg se v kosteh pojavi že v petem fetalnem mesecu. Ob rojstvu je rdeči kostni mozeg v vseh kosteh, po četrtem letu pa ga začne nadomeščati rumeni kostni mozeg. Rdeči kostni mozeg je pri zdravem odraslem prisoten v vretencih, lobanji, rebrih, medenici, stegenici in nadlahtnici. Krvotvorne celice ležijo v mrežju opornega tkiva in žil. Kapilarno mrežje v kostnem mozgu tvori sinusoidne, katere omogočajo prestopanje dozorelih krvnih celic v kri. Te strukture tvorijo hematopoetsko mikrookolje, ki omogoča diferenciacijo krvotvornih matičnih celic (Andoljšek, 2005).

Delitev in dozorevanje pluripotentne, multipotentne in usmerjene matične celice ter dozorevanje že diferenciranih krvotvornih celic uravnava vrsta humoralnih dejavnikov.

Imenujemo jih citokini. Na zorenje celic kostnega mozga vplivajo še drugi dejavniki: interleukini ter interferoni, ki spodbujajo ali zavirajo zorenje krvnih celic (Andoljšek, 2005; Vozelj, 2000).

Popkovnična kri je bogat vir krvotvornih matičnih celic, katere se po presaditvi naselijo v kostnem mozgu in tvorijo krvne celice. Vsebuje tudi mezenhimske prednamske celice, ki se lahko v telesu razvijejo v različna tkiva (stroma, hrustanec, mišično, kostno in vezivno tkivo) (Domanović, 2004).

1.1 NAMEN DELA

Namen našega dela je ugotoviti kakšno je preživetje človeških matičnih celic v vzorcu shranjene popkovnične krvi. CD34+ celice smo v popkovnični krvi določili zato, da se določi, ali je popkovnična kri primerna za nadaljnje shranjevanje. Mejna vrednost je 150.000 živih matičnih celic v celotni popkovnični krvi. Ta mejna vrednost pa je seveda manjša kot pri shranjevanju v javni banki.

Zanimalo nas je, kakšna je najnižja koncentracija monoklonskih protiteles CD34, CD45, s katero lahko še zanesljivo označimo vse matične celice (CD34+) v vzorcu. Ali na meritve vpliva koncentracija dodanih protiteles? S tem smo želeli ugotoviti, kakšna je najprimernejša koncentracija protiteles za izvajanje meritev.

Ravno tako smo izmerili tudi ponovljivost rezultatov.

Raziskovali smo vpliv časa na viabilnost matičnih celic v vzorcu. Zanimalo nas je, ali je možno, da bi uvedli merjenje viabilnosti matičnih celic v rutino trikrat tedensko, ali je potrebno vsakodnevno sprotne merjenje. V popkovnični krvi smo določali koncentracije celic CD34+ v vzorcu in nato opazovali vpliv časa na CD34+. Rezultate smo podali kot: koncentracijo viabilnih celic CD34+, število viabilnih celic CD34+, delež viabilnih celic CD34+ in delež viabilnih levkocitov v vzorcu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VRSTE MATIČNIH CELIC

2.1.1 Vrste matičnih celic glede na izvor

Embrionalne matične celice izvirajo iz celic embria v blastocisti, najpogosteje se pridobivajo s postopkom *in vitro* oploditve ali s kloniranjem. Pri pridobivanju embrionalnih matičnih celic zarodek uničimo, zato se glede njihove uporabe porajajo številna moralno-etična vprašanja. So pa najbolj »plastične« oziroma najbolj pluripotentne (Levičar in sod., 2009).

Najnovejše raziskave kažejo, da so v odraslih tkivih človeka prisotne tudi matične celice, ki so zelo podobne embrionalnim, našli so jih na primer v kostnem mozgu, testisih in v površinskem epiteliju jajčnika. Te matične celice pridobivamo iz folikularne tekočine. Embrionalne matične celice odraslega (ESC-A) so celice z lastnostmi embrionalnih matičnih celic (EMC), so torej pluripotentne in se nahajajo v odraslem organizmu. Prvič so jih izolirali iz površinskega epitelija jajčnika pri ženskah brez naravno prisotnih foliklov in jajčnih celic. ESC-A so pozitivne za označevalce embrionalnih matičnih celic. V pogojih *in vitro* se lahko razvijejo v druge tipe celic, celo v jajčnim podobne celice. Ni še jasno, ali se dejansko razlikujejo od EMC (Rožman in sod. 2007; Rožman in Jež 2009).

Tudi popkovnična kri vsebuje precejšnje število matičnih celic. Gre torej za celice, izolirane iz popkovnične krvi. Večina teh celic je krvotvornih matičnih celic in mezenhimskih matičnih celic. Izolacija teh celic moralno-etično ni sporna, saj se posteljica po rojstvu zavrže. Popkovnična kri je kri novorojenčka, ki se nahaja v posteljici in popkovnici. Uporablja se lahko za zdravljenje različnih krvnih bolezni, predvsem za zdravljenje levkemije pri otrocih. V ta namen so tako po svetu in pri nas nastale javne in komercialne banke, ki shranjujejo popkovnično kri darovalk. Uporaba lastnih (avtolognih) celic ima veliko prednost pred uporabo tujih (alogenskih) matičnih celic, saj pri njihovi presaditvi ne pride do zavrnitvene reakcije. Matične celice predstavljajo torej alternativo krvotvornim matičnim celicam iz kostnega mozga ali periferne krvi (Rožman in sod., 2007).

Matične celice odraslih tkiv in organov pridobivajo predvsem iz kostnega mozga, čeprav vsa tkiva odraslega človeka vsebujejo določene matične celice, ki so odgovorne za obnavljanje odmrlih celic ali popravljanje tkivnih poškodb. Ta organ ne vsebuje samo unipotentnih matičnih celic, kot večina drugih tkiv odraslega človeka, pač pa tudi delež multipotentnih in celo pluripotentnih matičnih celic. S starostjo pa njihovo število in kakovost upadeta. Vse krvne celice nastanejo iz matičnih celic v kostnem mozgu (Rožman in sod., 2007).

Večina matičnih celic pri odraslem človeku se nahaja v kostnem mozgu, vendar je mogoče pridobiti matične celice tudi iz periferne krvi, kajti nekaj matičnih celic je prisotnih tudi v krvnem obtoku. To pomeni, da je te tako imenovane periferne matične celice mogoče ločiti iz krvi. Z več zaporednimi citafereznimi postopki lahko zberemo iz venske krvi veliko število krvotvornih matičnih celic (KMC). Najpogosteje presajamo bolnikove lastne KMC (Domanović, 2007).

Do nedavnega je predstavljal glavni vir odraslih matičnih celic kostni mozeg. Alternativni vir mezenhimskih matičnih celic je maščobno tkivo. Sam kirurški postopek pridobivanja maščobnega tkiva je manj invaziven v primerjavi s pridobivanjem kostnega mozga, obenem pa lahko pridobimo tudi večje količine izhodiščnega materiala z večjim številom celic. Matične celice iz maščobnega tkiva so se sposobne diferencirati v različne celične tipe, kot so npr. maščobne celice, hondrociti, kostne in mišične celice. Poleg diferencijskega potenciala predstavljajo tudi močan potencial za tvorbo žilja ter vplivajo na imunski odziv organizma. Zaradi svojih lastnosti predstavljajo velik potencial za različne terapevtske aplikacije (Educell, 2011).

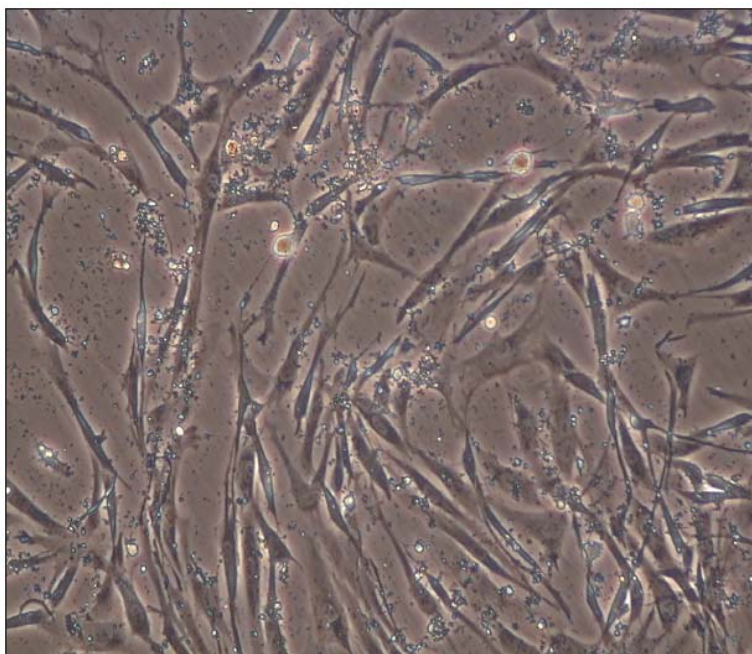
Človeški mlečni zobje so relativno enostavno dostopen vir multipotentnih matičnih celic. Izoliramo jih lahko iz koronarne pulpe izpadlega mlečnega zobka. Mlečni zobje naravno izpadejo, ko smo stari nekje med 5 in 12 let. *In vivo* imajo te matične celice sposobnost diferenciranja v nevrone, endotelijske celice, osteoblaste in hondrocite. Z namnoževanjem izoliranih celic pa je mogoče zagotoviti dovolj veliko število celic za celično terapijo, torej za transplantacijo in tkivni inženiring. Pomembno pa je, da mlečni zob ne izpade sam, ampak da ga, ko se maje in je torej še »živ« izpuli zobozdravnik (Miura in sod., 2003).

V zadnjem času pa se kot pomemben vir avtolognih matičnih celic obravnava tudi menstrualno kri. Borlongan in sodelavci namreč poročajo, da imunohistokemične analize kultivirane menstrualne krvi kažejo, da izražajo embrionskim podobne matične celice. Raziskave na podganah tudi kažejo, da bi bilo mogoče s tako pridobljenimi matičnimi celicami zdraviti kap brez uporabe imunosupresivnih zdravil, saj gre za avtologno presaditev matičnih celic (Borlongan in sod., 2010).

2.1.2 Vrste matičnih celic glede na vrsto

Krvotvorne matične celice (KMC) se od vseh vrst matičnih celic v medicini najbolj uspešno uporabljajo. Krvotvorne matične celice imajo multipotenten značaj in se lahko diferencirajo v vse krvne celice. S presaditvijo KMC zdravijo danes predvsem različne oblike levkemij, imunskih in genskih bolezni. Problem uporabe krvotvornih matičnih celic pa je ta, da je za uspešno klinično transplantacijo potrebna tkivna skladnost med darovalcem in prejemnikom. Skladnost določa histokompatibilnostni sistem MHC (angl. major histocompatibility complex), ki ga sestavljajo številne izjemno raznolike molekule, zato je skoraj nemogoče najti dve osebi z enakim sistemom MHC (Rožman in sod., 2007).

Mezenhimske matične celice so zelo redke in jih najdemo v kostnem mozgu, vendar pa jih je razmeroma enostavno osamiti iz vzorcev kostnega mozga in namnožiti do zadostnega števila, potrebnega za klinično uporabo. Gre za morfološko in fenotipsko zelo raznoliko populacijo matičnih celic. Z ustreznimi ravnimi dejavniki lahko te celice usmerimo v hrustančne, kostne, maščobne, mišične celice in celice vezivnega tkiva. Zato jih lahko uporabimo pri zlomih kosti, osteoporozi, obrabi hrustanca ipd. (Rožman in sod., 2007).



Slika 2: Mezenhimske matične celice (Rožman in sod., 2007: 208)

2.2 UPORABA POPKOVNIČNIH MATIČNIH CELIC

2.2.1 Potencialna uporaba matičnih celic iz popkovnične krvi

Ko se sprašujemo o uporabi matičnih celic, se je potrebno zavedati, da smo omejeni na uporabo celic v suspenziji, kajti ustvarjanje kompleksnih organov zaenkrat še ni mogoče. V ZDA so prve poskuse zdravljenja levkemije pri otroku pričeli že v letu 1972. V letu 1988 so v Franciji prvič uspešno presadili sorodno popkovnično kri otroku s Fanconijevo anemijo. V letu 1993 so prvič uporabili alogeno popkovnično kri za presaditev pri otroku z akutno limfoblastno levkemijo (Domanović, 2007).

Popkovnična kri je klinično pomembna zaradi vsebnosti hematopoetskih in progenitoskih celic, katere omogočajo širok spekter tako malignih kot tudi nemalignih bolezni (Broxmeyer, 2010).

Popkovnična kri ima zaradi posebnih bioloških in drugih značilnosti v primerjavi s kostnim mozgom ali KMC iz periferne krvi lažjo in večjo dostopnost, manjše tveganje za prenos virusnih okužb, manjše pa je tveganje tudi za zavrnitev presadka. Veliko potencialno

dostopnost zagotavlja preko 100 milijonov porodov letno po vsem svetu (Koblas in sod., 2005). Ena glavnih prednosti je večje dovoljeno število neujemanj v antigenih HLA z enako klinično učinkovitostjo, kot je pri presaditvi nesorodnih darovalčevih krvotvornih matičnih celicah pri odraslih. Glavna pomanjkljivost pa je premajhno število krvotvornih matičnih celic v popkovnični krvi. Količina je praviloma tolikšna, da zadostuje za presajanje pri otrocih oziroma osebah s telesno maso nižjo od 40 kg (Domanović, 2004).

Broxmeyer (2010) trdi, da problem predstavlja prepočasna delitev matičnih celic iz popkovnične krvi v primerjavi z matičnimi celicami iz kostnega mozga, medtem ko nekateri avtorji trdijo, da je obnova nevtrofilcev v primerjavi z uporabo kostnega mozga sicer upočasnjena, vendar pa dolgoročno gledano ni razlike (Niehues in sod., 2001).

V kolikor količina matičnih celic v popkovnični krvi enega darovalca ne zadostuje za prejemnika, lahko tudi združimo kri dveh različnih darovalcev, vendar pa se tedaj pojavi večja verjetnost za zavrnitveno reakcijo (Broxmeyer, 2010).

Velika prednost vzpostavitve bank in registrov popkovnične krvi je vsekakor ta, da so celice iz popkovnične krvi hitreje pripravljene za uporabo kot celice iz kostnega mozga. Banke pa lahko shranjujejo tudi velike količine popkovnične krvi. In ker je pri uporabi matičnih celic iz popkovnične krvi ujemanje v HLA antigenih lahko manjše kot pri uporabi matičnih celic iz kostnega mozga, bi tako tudi večkrat našli kri, ki bi jo lahko uporabili (Reimann in sod., 2009).

Le od 20 do 25 % bolnikov namreč med svojimi sorojenci najde primerne darovalca za darovanje kostnega mozga. Prav tako celice iz popkovnične krvi niso tako imunogene kot celice, pridobljene iz kostnega mozga, zaradi česar je prognoza za bolnika boljša (Sanberg in sod., 2005).

Manjša imunogenost naj bi bila povezana z daljšimi telomerami, ki so prisotne v mlajših celicah, medtem ko so telomere v matičnih celicah odraslih krajše. Telomere v embrionskih matičnih celicah so daljše kot telomere v matičnih celicah, izoliranih iz popkovnične krvi (Gammaitoni in sod., 2004).

Matične celice iz popkovnične krvi lahko zamrznemo, če kri izpolnjuje kriterij 150.000 živih matičnih celic v celotni popkovnični krvi. Število celic je možno povečati tudi z gojenjem v gojiščih izven telesa (Domanović, 2004).

Zaradi velikih stroškov pri shranjevanju je politika večine javnih krvnih bank, da ne shranijo vse popkovnične krvi, ki je darovana, ampak samo tisto, ki bi jo tudi lahko uporabili. Tako mora volumen popkovnične krvi biti večji ali enak 60 mL in kri mora vsebovati vsaj 8×10^8 nukleotidnih celic v celotni popkovnični krvi (Urciuoli in sod., 2010).

Pri nas so prvo presaditev matičnih celic iz popkovnične krvi opravili pri bolniku z mielodisplastičnim sindromom avgusta 2004. Trenutno se s tem načinom lahko zdravijo nekatere rakave bolezni krvi (levkemija, limfom), dedne motnje imunskega sistema in presnove. Zdravljenje drugih bolezni, kot so Parkinsonova in Alzheimerjeva, diabetes, mišična distrofija, multipla skleroza, poškodbe hrbtenjače, bolezni srca in jeter, pa še raziskujejo. Do sedaj se torej matične celice uporabljajo predvsem pri zdravljenju levkemij (Levičar in sod., 2009).

Aktivnih je več različnih kliničnih študij. Sicer študije večinoma vključujejo odrasle matične celice pridobljene iz kostnega mozga, vendar vsako novo spoznanje na tem področju, vodi v širšo uporabo tudi matičnih celic iz popkovnične krvi. Za zdravljenje začetne stopnje diabetes tipa 1 so pacientom transplantirali lastne krvotvorne matične celice. Prav tako se kaže, da bi bilo matične celice mogoče uporabiti v ortopediji. Nekatere izmed kliničnih študij so že prestale I. in II. fazo kliničnega testiranja s spodbudnimi rezultati. Velike firme kot so Pfizer, GlaxoSmithKline, Oziris in Geron, vlagajo velike vsote v razvoj terapevtikov iz matičnih celic. Zaenkrat je uspel razvoj terapevtika imenovanega Prochymal iz odraslih matičnih celic in je v zaključni fazi kliničnih preizkusov na področju zavrnitve transplantantov po presaditvi. Če se terapevtik izkaže kot učinkovit, ga bo mogoče uporabiti pri zdravljenju diabetesa tipa I in srčnega infarkta. Prochymal je pripravljen iz mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz kostnega mozga zdravih darovalcev. Celice nato v laboratoriju pomnožijo in tako iz 60 ml kostnega mozga pripravijo 10 000 terapevtika. Vendar pa je vseeno potrebno raziskati še varnost in stranske učinke terapije z matičnimi celicami (Levičar in sod., 2009).

Matične celice bi lahko uporabljali tudi za produciranje eritrocitov in trombocitov, katere bi lahko uporabljali v transfuzijske namene. To bi imelo bistven pomen, kajti eritrociti in trombociti ne preživijo dolgo časa v pogojih *ex vivo*. Tako bi bilo zelo priročno, če bi lahko namnoževali rdeče krvničke tipa 0. Raziskave tega področja so na dobri poti, vendar ostajajo odprta različna vprašanja. Ne ve se namreč, ali lahko namnožitve ponavljamo zmeraj znova na isti starterski kulturi. Prav tako se ne ve, ali lahko populacija CD34+ celic v zbrani enoti krvi generira npr. več eritrocitov, kot jih je že prisotnih v tej zbrani enoti krvi. Nadalje se tudi ne ve, ali so generirane celice enako primerne za *in vivo* uporabo kot »originalni« eritrociti iz zbrane enote krvi (Broxmeyer, 2010).

Večina raziskav o uporabi matičnih celic je še v predklinični fazi, vendar se raziskovalci trudijo najti način, kako celice uporabiti pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, zdravljenju posledic kapi, torej posledic tako na možganih kot na srcu, zamenjavi srčnih zaklopk in drugih boleznih. Rezultati na živalskih modelih so obetavni (Sanberg in sod., 2005).

V svetu je bilo opravljenih že več kot 20.000 transplantacij matičnih celic iz popkovnične krvi, kar dokazuje, da je popkovnična kri dober in klinično pomemben vir matičnih celic (Broxmeyer, 2010).

2.2.2 Dejanska uporaba matičnih celic iz popkovnične krvi

2.2.2.1 Prva uporaba

Prvo zdravljenje s pomočjo matičnih celic iz popkovnične krvi sega v leto 1988, ko so Gluckman in sod. (1989) zdravili 5-letnega dečka, ki je imel diagnosticirano Fanconijevo anemijo. Fanconijeva anemija je avtosomalna recesivna motnja. Deček je prejel popkovnično kri svoje sestre, pri kateri so prenatalna testiranja pokazala, da ima normalni kariotip, je zdrava in je HLA identična svojemu bratu. Kri je bila zamrznjena brez dodajanja dimetil sulfoksida. Shranili so tudi placentarno kri. Starši so bili zdravi in v družini ni bilo nobenih krvnih motenj. Krvna skupina dečka je bila B Rh+, krvna skupina njegove sestre pa 0 Rh+.

Pred infuzijo popkovnične krvi ni bilo nobenih komplikacij v poteku bolezni, funkcija jeter in ledvic je bila normalna, serološki test je bil pozitiven za cytomegalovirus in negativen za toksoplazmozo in hepatitis B. Deček je pred infuzijo prejel antibiotično zdravljenje. Obenem je prejel še antimikotik in antivirotik kot zaščito pred glivno infekcijo in virusom *herpes simplex*. Dan pred napovedanim posegom je bil deček izpostavljen radiaciji. Obsevali so prsni koš in trebušno votlino. Na dan posega so popkovnično kri odmrznili in jo brez nadaljnjega procesiranja pripravili za infuzijo. V odmrznjeni krvi se je obnovilo od 79 do 90 odstotkov vseh celic z jedrom. Po posegu se je dečku znižal pritisk in popadla ga je mrzlica. Vendar so ti simptomi izzveneli. Pet mesecev po transplantaciji je bil deček odpuščen. Število krvnih celic se je začelo normalizirati.

2.2.2.2 Trenutna klinična uporaba

Dosedanje znanje omogoča uporabo matičnih celic iz popkovnične krvi predvsem pri hematopoetskih boleznih. Za zdravljenje hematopoetskih boleznih so matične celice iz popkovnične krvi po svetu v rutinski uporabi že 10 let. Poskusi, izvedeni na živalskih modelih, predvidevajo, da bi lahko bile te celice uporabljene tudi v regenerativni medicini, vendar ta potencial celic lahko izkoristimo samo, če celice niso zamrznjene, ampak uporabimo sveže (Reimann in sod., 2009).

Preglednica 1: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot standardna terapija (Verter, 2011)

RAKAVA OBOLENJA KOSTNEGA MOZGA	Multipli mielom
	Levkemija plazemskih celic
	Waldenstromova makroglobulinemija
SOLIDNI TUMORJI	Nevroblastom
	Retinoblastom
AKUTNE LEVKEMIJE	Akutna limfoblastna levkemija
	Akutna mielogena levkemija
	Akutna bifenotipna levkemija
	Akutna nediferencirana levkemija
KRONIČNE LEVKEMIJE	Kronična mielogena levkemija
	Kronična limfocitna levkemija
	Juvenilna kronična mielogena levkemija
	Juvenilna mielomonocitna levkemija
MELODISPLASTIČNI SINDROMI	Refraktorne anemije
	Kronična mielomonocitna levkemija
LIMFOMI	Hodgkinov limfom
	Ne-Hodgkinovi limfomi (Burkittov limfom)
DEDNE NEPRAVILNOSTI RDEČIH KRVNIČK	Beta talasemija major
	Anemija Blackfran-Diamond
	Čista aplazija rdečih krvničk
	Anemija srpastih celic

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 1.

Preglednica 1: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot standardna terapija (Verter, 2011)

MOTNJE POLIFERACIJE KRVNIH CELIC	ANEMIJE	Huda aplastična anemija
		Kongenitalna diseritropoetična anemija
		Fanconijeva anemija
		Paroksizmalna nočna hemoglobinurija
		Aplazija rdečih celic
	DEDNE NEPRAVILNOSTI TROMBOCITOV	Kongenitalna trombocitopenija
		Glanzmannova trombastenija
	MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI	Akutna mielofibroza
		Prava policitemija
		Esencialna trombocitemija
	MOTNJE DELOVANJA FAGOCITOV	Sindrom Chediak-Higashi
		Kronična granulomatozna bolezen
		Pomanjkanje aktina v nevtrofilcih
Retikularna disgeneza		
DEDNE MOTNJE IMUNSKEGA SISTEMA	HUDA KOMBINIRANA IMUNSKA INSUFICIENCA	SCID ob pomanjkanju adenzin deaminaze
		SCID vezana na X-kromosom
		SCID s pomanjkanjem T in B celi
		SCID s pomanjkanjem T celic in normalnimi B celicami
		Sindrom Omenn
	NEVROPENIJE	Sindrom Kostmann
		Mielokateza
	DRUGE DEDNE MOTNJE	Ataksija-teleangiectazija
		Sindrom golih limfocitov
		Običajna variabilna imunodeficienca
		DiGeorge sindrom
		Motnja adhezivnosti levkocitov
		Limfoproliferativne motnje
	Sindrom Wiskott-Aldrich	

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 1.

Preglednica 1: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot standardna terapija (Verter, 2011)

DEDNE METABOLNE MOTNJE	MUKOPOLOSAHARIDOZE	Mukopolisaharidoze
		Hurler Sindrom
		Hunter Sindrom
		Sanfilippo sindrom
		Sindrom Sly
		Mukolipidoza II
	LEVKODISTROFIJE	adrenomielinevropatija
		Krabbova bolezen
		Metakromatska levkodistrofija
		Pelizaeus-Merzbacherjeva bolezen
	LIZOSOMALNE BOLEZNI KOPIČENJA	Gaucherjeva bolezen
		Niemann-Pickova bolezen
		Sandhoffova bolezen
		Tay-Sachsova bolezen
		Wolmanova bolezen
	DRUGE DEDNE MOTNJE	Lesh-Nyhanova bolezen
		Osteopetroza

Preglednica 2: Bolezni, za katere je zdravljenje z matičnimi celicami iz popkovnične krvi v fazi kliničnih testiranj (Verter, 2011)

AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI	Lupus
	Diabetes tipa 1
	Chronova bolezen
OKVARE ŽIVČNEGA SISTEMA	Multipla skleroza
	Poškodbe hrbtenjače
	Travmatske poškodbe možganov
	Cerebralna paraliza
MOTNJE CELIČNE POLIFERACIJE ALI METABOLIZMA	Cistična fibroza
	Bolezni histiocitov
	Bulozna epidermoliza
ZDRAVLJENJE KARDIOLOŠKIH OBOLENJ	Miokardni infarkt
	Angina pectoris
	Kardiomiopatija
TRANSPLANTACIJE PRI RAKAVIH TUMORJIH	Karcinom dojke
	Karcinom ledvičnih celic
	Ewingov sarkom
»POPRAVILA« ORGANOV	Obnavljanje vida z razvojem nove roženice
	Obnavljanje vida z obravnavo makularne degeneracije

Preglednica 3: Bolezni, pri katerih se matične celice iz popkovnične krvi uporabljajo kot eksperimentalno zdravilo (Verter, 2011)

AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI	Revmatoidni artritis	
	Juvenilni artritis	
	Juvenilni dermatomiozitis	
	Skleroderma	
GENSKA TERAPIJA	Fanconijeva anemija	
	Levkodistrofije in druge metabolne motnje	
	Parkinsonova bolezen	
OBNOVA ŽIVČNIH CELIC	BOLEZNI CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA	Alzheimerjeva bolezen
		Huntingtonova bolezen
		Parkinsonova bolezen
		Duchennova mišična distrofija
	Amiotrofična lateralna skleroza	
	DRUGE OBLIKE POŠKODB ŽIVČNIH CELIC	Izguba sluha
Okrevanje po kapi		

Diabetes tipa 1 je avtoimunska bolezen, ki je diagnosticirana pri otrocih in mladostnikih in je posledica selektivnega uničenja celic beta, ki je verjetno posledica nenehnega avtoimunskega delovanja. Celice beta pa producirajo inzulin; ravno zaradi tega so otroci vse življenje odvisni od sintetičnega inzulina. Nekoč usodna bolezen je postala kronična ravno zahvaljujoč odkritju sintetičnega inzulina. Raziskave na živalskih modelih so pokazale, da bi bilo matične celice iz popkovnične krvi možno uporabiti tudi v namene zdravljenja diabetesa. Raziskovalci se predvsem nadejajo, da bi z uporabo matičnih celic spodbudili regeneracijo poškodovanega tkiva in zaščito beta celic, ki jih otrok še ima. Avtorji raziskave ponovno navajajo že poznane prednosti matičnih celic iz popkovnične krvi v primerjavi s kostnim mozgom (Haller in sod., 2008). Nadalje pa je največja prednost ta, da so bile matične celice iz popkovnične krvi uspešno usmerjene v diferenciacijo inzulina in C-peptida (Denner in sod., 2007).

V študiji Hallerja in sod. (2008) je lahko sodeloval vsak otrok, starejši od enega leta, ki je imel shranjeno popkovnično kri, je imel normalno krvno sliko in je bil brez drugih zdravstvenih težav. Zahtevano je bilo tudi, da v času odvzema materina kri in enota popkovnične krvi nista bili kontaminirani. Viabilnost celic v popkovnični krvi pa je morala biti vsaj 50 %. Po tem, ko so izbrali primere za študijo, so ponovno preverili ustreznost krvi in jo HLA tipizirali. Bolnik je dobil celice iz popkovnične krvi (navadno manj kot 100 mL) intravenozno. Bolniki so že naslednji dan lahko odšli domov in so nato bili spremljani še dve leti. V študiji je sodelovalo 15 otrok. Raziskovalci so ugotovili, da je avtologna infuzija celic iz popkovnične krvi varna, da ne povzroča smrtnosti in drugih zapletov, vendar pa ta metoda ne ohranja C-peptida. Avtorji navajajo, da je morda problem v tem, ker se v zasebnih bankah shrani vsa kri in je celotno število celic nižje kot v javnih bankah.

Denner in sod. (2007) so uspešno inženirali CD34⁺, CD133⁺ in negativno linijo (CD133/CD34⁺) celice v C-peptid, ki vsebuje fenotip inzulina. Dokazali so, da celice vsebujejo C-peptid, ki nastane pri *de novo* sintezi in procesiranju pre-proinsulinske mRNA, in torej inzulin nastane pri *de novo* sintezi in ni prevzet iz medija. In ker je C-peptid lahko le produkt *de novo* sinteze in procesiranja pre-proinzulinske mRNA in proteinov, rezultati te študije dokazujejo, da je popkovnična kri lahko inženirana tako, da zagotovi *de novo* sintezo inzulina.

Kangu in sod. (2005) je uspel preboj naprej. Popkovnično kri so uporabili za zdravljenje poškodb hrbtenjače pri 37 let stari ženski. Bolnica je bila paraplegik. Zbrali so svežo popkovnično kri, kar pomeni, da kri pred tem ni bila zamrznjena. Kri so obdelali v 24 urah po tem, ko je bila zbrana. Mononuklearne celice so ločili iz popkovnične krvi z uporabo Ficoll-PaqueTM PLUS in jih suspendirali v medij za kultivacijo, ki je vseboval tudi penicilin in streptomycin, L-glutamine in natrijev piruvat. Po 7 dneh so suspendirane celice odstranili, pritrjene celice pa so gojili še naprej. Celice so gojili pri 37 °C. Tako pripravljene multipotentne celice iz HLA ujemajoče se popkovnične krvi so transplantirali direktno v poškodovano hrbtenjačo. Hrbtenjača je bila poškodovana med 11. in 12. torakalnim vretencem. Poškodba je bila stara več kot 19 let, preden je bolnica prejela multipotentne celice iz popkovnične krvi. Bolnica je že 15. dan po presaditvi lahko

premikala kolke in dvignila spodnji del noge za približno 1 cm. 25. dan po transplantaciji so se noge odzvale na stimulacijo. Slikanja z magnetno resonance in računalniško tomografijo sta pokazali regeneracijo hrbtnjače na poškodovanem delu. Popkovnična kri je v tem primeru primernejša od kostnega mozga, ker je manjša verjetnost, da je okužena s katerim izmed virusov, ki bi se lahko prenesel na prejemnika in ker je diferenciacija celic v kostnem mozgu z leti manjša, obenem pa je tudi sama koncentracija celic manjša. Prav tako pa tudi po presaditvi niso potrebni tako veliki odmerki imunosupresivov, za katere vemo, da imajo neželene stranske učinke.

Wang in sod. (2005) so popkovnično kri uporabili pri šestih pacientih v starosti od 14 do 32 let in so tehtali med 47 in 95 kilogrami. Diagnosticirano so imeli visoko rizično akutno levkemijo. Vsak pacient je prejel dve enoti nesorodne popkovnične krvi. Pri štirih od šestih pacientov je število hematopoetskih celic naraslo. En pacient je umrl 21. dan po transplantaciji zaradi infekcije. Enemu pacientu pa so transplantirali še eno enoto krvi. Pri pacientih niso zaznali mešanega himerizma. Pojavil se ni noben kronični GVHD. Štiri leta po presaditvi sta bila dva pacienta živa in brez bolezni.

Staba in sod. (2004) so uporabili nesorodno popkovnično kri pri zdravljenju Hurlerjevega sindroma. Hurlerjev sindrom povzroča progresivno poslabšanje živčnega sistema in povzroča smrt že v otroštvu. Alogenska presaditev kostnega mozga pred drugim letom starosti bolezen umiri in podaljša življenje, vendar pri veliko otrocih ne najdejo primerne donorja kostnega mozga. Nobeden izmed 20 otrok, pri katerih so uporabili nesorodno popkovnično kri, ni zbolel za kronično GVHD. Otroke se je sledilo od leta dni do osmih let in 17 otrok je preživel. Povprečna starost otroka ob transplantaciji je bila 16 mesecev. Za transplantacijo so izbrali kri, ki se je ujemala v vsaj treh od šestih HLA fenotipa in je vsebovala vsaj 3×10^7 celic z jedrom na kilogram telesne teže darovalca. Zmrznjeno kri so odtalili in jo procesirali po standardnem protokolu, prešteli so progenitorkse celice, CD34+ celice in celice z jedrom. Prav tako pa so pred infuzijo kri nasadili na glivne in bakterijske kulture. Tako avtorji predlagajo, da je pristop, ko uporabimo popkovnično kri namesto kostnega mozga, v tem primeru boljše izbira, saj pri presaditvi kostnega mozga prihaja do večjih zapletov in so rezultati zdravljenja slabši. Prav tako avtorji navajajo, da je iskanje HLA ujemajoče se popkovnične krvi bistveno manj zamudno in je primernejše v primerih,

kot je Hurlerjev sindrom, ker je hitro ukrepanje ključnega pomena. Prav tako pa problem pri presaditvi kostnega mozga predstavlja mešan himerizem, medtem ko pri uporabi popkovnične krvi prejemnik popolnoma prevzame himerizem donorja. Prav tako je pri uporabi popkovnične krvi manjša verjetnost za nastanek kroničnih GVHD in je manjša tudi smrtnost zaradi GVHD. Obenem pa je popkovnična kri uporabnejša, ker ujemanje v HLA ni nujno 100 %, torej 6/6.

2.3 ODVZEM POPKOVNIČNE KRVI

Ker krvotvorne matične celice z leti izgubljajo na sposobnosti rasti in speciaciji v želeno tkivo, je pomembno, da se odvzamejo in shranijo pri rojstvu, saj so v tem obdobju na vrhuncu svoje moči.

Bodoči starši dobijo informacije od svojega osebnega ginekologa, ta izpolni obrazec z anamnestičnimi podatki in ga pošlje na sedež podjetja, ki se ukvarja s hrambo popkovnične krvi. Ta bodočim staršem na dom pošlje set za odvzem krvi. V Sloveniji sta trenutno dve podjetji, pri katerih je možno kupiti set. Možno pa se je tudi odločiti za darovanje popkovnične krvi v javno banko. Te zbirajo in shranjujejo zmrznjene in HLA tipizirane enote popkovnične krvi (Prelec, 2007).

Kadar se odločimo za darovanje popkovnične krvi javni banki, se moramo odločiti za darovanje do 34. tedna nosečnosti. Kadar darujemo v javne namene, mora imeti nosečnica negativne teste na prisotnost nalezljivih bolezni (HIV, hepatitis, CMV, HTLV in sifilis), prav tako pa v njeni družini in v družini biološkega očeta ne sme biti genetskih bolezni (hemofilija, avtoimunske bolezni). Vendar pa v javni banki ne spravijo vse darovane krvi. Kri zavrnejo, v kolikor je pri odvzemu prišlo do kontaminacije in kadar je krvi volumsko premalo.

Odvzem popkovnične krvi je popolnoma varen in neboleč postopek tako za mater kot za otroka. Popkovnične krvi novorojenček po rojstvu ne potrebuje več, zato se ta skupaj s popkovnico in posteljico zavrže, v kolikor se ne odločimo za shranjevanje. Odvzem popkovnične krvi se odvzame po pravilu sterilnosti. Pred odvzemom krvi je popkovnico potrebno tudi razkužiti. Ko je otrok rojen in je popkovnica že prerezana, zabodejo iglo v

veno popkovnice. Posteljica je tedaj še v maternici. Kri po cevki steče v sterilno vrečko, namenjeno zbiranju popkovnične krvi. V vrečki je dodan antikoagulant. Kri se torej nato v mikrobioloških laboratorijih testira na prisotnost infekcijskih agensov in mikrobioloških kontaminacij krvi. Nato iz zbrane krvi izolirajo krvotvorne matične celice (z metodo centrifugiranja), jih preštejejo in opravijo pregled kakovosti in vitalnosti. Celice razdelijo v dva vzorca, ju ustrezno označijo s črtno kodo in shranijo v tekočem dušiku. Minimalni volumen krvi, ki se shrani, je med 40 in 60 mL. Odvzem popkovnične krvi se izvede pri približno 2 % vseh porodov. Popkovnična kri se ne odvzame, kadar ima mati infekcijska obolenja, ki bi lahko pripeljala do perinatalne infekcije novorojenčka, kadar so se v pozni nosečnosti pojavili hudi zapleti, pri prezgodnjem porodu ali pri težji asfiksiji novorojenčka (Prelec, 2007).

Osnovna navodila za izvedbo posega

Odvzem krvi moramo izvršiti pred porodom posteljice (Prelec, 2007):

- popkavnico prekinemo s prijemalko čim bliže otroku, z drugo prijemalko pa 5 cm višje;
- popkavnico prerežemo;
- pred razkuževanjem s sterilnim zložencem, popkavnico očistimo vseh možnih onesnaženj (ostanki krvi, sekreta iz nožnice);
- razkužimo z razkužilom in počakamo, da se razkužilo posuši (0,5 do 2 minuti);
- odpremo komplet in s punkcijsko iglo punktiramo kri iz popkovnične vene;
- iz popkovnice odvezemo največjo možno količino krvi;
- če je potrebna punkcija iz druge žile, vbodno mesto očistimo še enkrat po istem postopku;
- če se posteljica rodi in v zbiralni vrečki še ni dovolj krvi, lahko naredimo punkcijo žile na površini posteljice;
- med odvzemu namestimo zbiralno vrečko nižje od višine postelje in jo večkrat obrnemo; nekatere vrečke že vsebujejo antikoagulate;
- po končanem odvzemu zapremo varnostna zapirala, punkcijski sistem prekinemo (lahko uporabimo sponko za popek) ali zavozlamo;

- zbiralno vrečko opremimo z nalepko, ki vsebuje podatke o otroku in materi, načinu poroda in oceni po Apgarjevi lestvici ter shranimo v embalažo, v kateri je želatinasta vrečka;
- v paket priložimo dve epruveti materine krvi, ki jo v 48. urah po porodu še enkrat testirajo na označevalce okužb (sifilis, hepatitis tipa B in C ter AIDS),
- vse skupaj shranimo v embalažo iz stiroporja (sobna temperatura);
- starši pokličejo transportno službo, ki dostavi paket v zeleno krvno banko v 48. urah.

2.4 SHRANJEVANJE POPKOVNIČNE KRVI

Popkovnična kri se po odvzemu, mikrobiološkem pregledu, določitvi viabilnosti, HLA-tipizaciji in ločevanju različnih vrst celic zamrzne in shrani pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v tekočem dušiku. HLA-tipizacija je potrebna samo v primeru, da popkovnično kri shranimo v javni banki, v kolikor jo shranimo v zasebni banki, to ni potrebno. Celicam dodamo krioprotektant nato pa jih počasi zamrznemo. Pomembno je, da jih ne zamrznemo prehitro, ker bi v celicah, kjer je velika prisotnost vode, nastali kristali in bi celice s tem poškodovale. Poškodbe pa lahko nastanejo tudi zaradi prepočasnega zamrzovanja. Zato je hitrost, s katero se zamrzuje matične celice, od $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na minuto. Navadno se uporablja protokol: $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na minuto do temperature $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nato $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na minuto do temperature $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako zagotovimo, da v celici ne nastanejo veliki kristali, ki bi jo po odmrzovanju poškodovali do te mere, da celica ne bi preživela. Krioprotektanti, ki jih dodajamo, so kemične snovi, ki zaradi svoje strukture tvorijo z vodo številne vodikove vezi in s tem preprečijo nastanek ledenih kristalov (Reboredo in sod., 2000).

Za zamrzovanje matičnih celic in popkovnične krvi se uporablja v/v 20 % raztopina DMSO (dimetil sulfoxid) in 80 % dekstran (Rebulla in sod., 2007).

Ta krioprotektant je dovolj majhen, da preide v celico. Tako shranjene celice lahko shranjujemo neomejeno dolgo, vprašanje pa je, po kolikšnem času zamrzovanja so še sposobne razmnoževanja. V laboratorijskih pogojih so uspešno namnožili matične celice, ki so bile zamrznjene 15 let (Reboredo in sod., 2000).

Popkovnično kri v glavnem zbirajo v javnih bankah, katere tesno sodelujejo z nacionalnimi registri nesorodnih darovalcev krvotvornih matičnih celic (NDKMC). Slednji pa koordinirajo delovanje med vsemi domačimi in mednarodnimi ustanovami. Glavna naloga registrov je, da omogočijo zdravnikom izbor ustreznega, tkivno skladnega darovalca krvotvornih matičnih celic za zdravljenje njihovega bolnika. Registri so standardizirani in avtomatizirani in se združujejo v svetovni register darovalcev kostnega mozga – World Marrow Donors Association (WMDA). Največ presaditev popkovnične krvi opravijo v ZDA, sledi Evropa in nato Daljni vzhod (Tonejc, 2007).

Ugotovljeno je bilo, da je koncentracija hematopoetskih celic v popkovnični krvi podobna koncentraciji hematopoetskih celic v kostnem mozgu za transplantacijo. Zato bi bilo nadvse primerno, če bi lahko shranili popkovnično kri od vsakega poroda in jo nato uporabili za transplantacijo, saj bi s tem veliko več ljudem, ki transplantacijo potrebujejo, to tudi lahko omogočili; če ne v sedanjosti, pa v prihodnosti, ko bodo raziskave na področju uporabe matičnih celic iz popkovnične krvi še napredovale in prinesle zadovoljive rezultate. Vendar pa je shranjevanje v tekočem dušiku drago in prostorsko smo zelo omejeni, kajti ko popkovnični krvi dodamo še krioprotektant, moramo shraniti enoto velikosti 350 mL in več (Rubinstein in sod., 1995).

Tako so se raziskovalci lotili raziskav, kako bi lahko kri skoncentrirali, vendar so ugotovili, da so postopki preveč zahtevni, da bi jih vpeljali v rutino, obenem pa so tudi predragi. Prav tako izgubimo veliko količino progenitorskih celic, kar ni sprejemljivo, hkrati pa del hematopoetskih celic uničimo že pri zamrzovanju in nato odtajanju. Zato je izrednega pomena, da se v javnih bankah shrani zgolj tista kri, ki jo bo najverjetneje tudi možno uporabiti (Rubinstein in sod., 1995).

Kri, ki je primerna za darovanje, mora po kriterijih Eurocorda in nekaterih avtorjev vsebovati minimalno 3×10^7 celic z jedrom na kilogram telesne teže ali vsaj 2×10^5 CD34+ celic/kilogram telesne teže. Zato naj bi upoštevali dve priporočili: popkovnična kri se ne sme v HLA-tipizaciji razlikovati v več kot 2 antigenih in mora zadostiti kriteriju $\geq 3 \times 10^7$ celic z jedrom/kg ali $\geq 2 \times 10^5$ CD34+ celic/kg. Pri nemalignih obolenjih, kjer je tveganje zavrnitvene reakcije večje, pa je treba zavrniti enote krvi, ki imajo $< 3-5 \times 10^7$ celic z jedrom/kg in dve ali več HLA inkompatibilnosti. In v kolikor ne najdemo ene enote

popkovnične krvi s temi karakteristikami, se lahko uporabi dve enoti, ki pa morata skupaj vsebovati $\geq 3 \times 10^7$ celic z jedrom/kg in ne sme biti več kot ena HLA razlika med prvo enoto krvi, drugo enoto krvi in prejemnikom.

2.4.1 Odmrzovanje enot krvi po shranjevanju v tekočem vodiku

Enota krvi, ki jo odtajamo, je najprej dvignjena v plinsko fazo vodika za 15 min. in nato izpostavljena sobni temperaturi za nadaljnjih 5 min. S tem omogočimo, da plastična vreča obnovi svojo elastičnost. Nato enoto krvi potopimo v vodo, ki ima 37 °C, da se kri odtali čim hitreje, najprimerneje je, da se v manj kot 2 minutah odmrzne celotna enota krvi. Takoj ko je enota odtaljena, jo razredčimo z enako količino raztopine človeških albuminov, dekstrana in slane izotonične raztopine. Kri nato centrifugiramo na 400 xg za 10 min., po centrifugiranju odstranimo supernatant in sedimentirane celice so počasi resuspendirane v raztopini dekstrana in albuminov do primernega volumna za infuzijo v pacienta (Rubinstein in sod., 1995).

2.5 Vpliv raznih dejavnikov na količino popkovnične krvi in število celic v njej

Volumen zbrane popkovnične krvi je signifikantno povezan s številom CD34+ celic in številom celic z jedrom. Večji kot je volumen zbrane popkovnične krvi, večje je število CD34+ in število celic z jedrom v njej. Na število celic v zbrani popkovnični krvi prav tako vpliva čas od takrat, ko smo kri zbrali, do procesiranja krvi. Prav tako pa na število celic v popkovnični krvi in na sam volumen zbrane krvi vplivajo tako materalni kot tudi neonatalni dejavniki (Nakagawa in sod., 2004).

2.5.1 Materine lastnosti, ki vplivajo na količino popkovnične krvi in število celic v njej

Višja koncentracija CD34+ celic je povezana z leti porodnice. Mlajša kot je porodnica, večja je koncentracija CD34+ celic v zbrani popkovnični krvi. Na količino zbrane krvi pomembno vpliva dolžina popkovnice in teža posteljice. Daljša kot je popkovnica in težja kot je posteljica, večji bo volumen zbrane krvi, kar pa posledično vpliva na koncentracijo CD34+ celic in koncentracijo celic z jedrom (Nakagawa in sod., 2004).

Na volumen krvi pa poleg teže posteljice vpliva tudi čas od poroda do časa, ko prevežemo popkovnico. Večja kot je teža posteljice in krajši kot je čas od poroda do preveza popkovnice, večji je volumen zbrane krvi (Donaldson in sod., 1999).

Rasa porodnice naj ne bi imela vpliva na noben parameter (količina popkovnične krvi, koncentracija celic z jedrom in CD34+ celic). Kajenje ni pokazalo nobenega vpliva na koncentracijo celic z jedrom in na volumen popkovnične krvi. Koncentracija CD34+ celic v popkovnični krvi kadilk pa je bila nižja kot v popkovnični krvi nekadilk. Vendar pa so novorojenčki kadilk praviloma manjši od novorojenčkov nekadilk, kar bi lahko povezali s tem, da manjši kot je novorojenček, nižji je volumen zbrane popkovnične krvi in posledično je nižja koncentracija CD34+ celic (Ballen in sod., 2001).

Na koncentracijo celic z jedrom vpliva tudi trajanje popadkov oziroma trajanje poroda. Dlje kot porod traja, večja je koncentracija celic z jedrom v popkovnični krvi. Praviloma pa so daljši popadki pri prvem otroku in ravno pri prvem otroku je po rezultatih raziskav večja koncentracija celic z jedrom v popkovnični krvi (Donaldson in sod., 1999).

Prav tako ima velik vpliv število porodov. Pri prvem otroku je volumen popkovnične krvi večji, prav tako pa je večja tudi koncentracija celic z jedrom in CD34+ celic (Ballen in sod., 2001).

Na Finskem so Aroviita in sod. (2004) dokazali, da je koncentracija CD34+ celic enaka v popkovnični krvi porodnic z diabetesom v primerjavi koncentracije CD34+ celic v popkovnični krvi porodnic, ki niso imele diabetesa. Prav tako pa se ne razlikuje koncentracija celic z jedrom. Dokazali so tudi, da je pri porodu s pomočjo carskega reza statistično značilna povezava med porodno težo novorojenčka in koncentracijo CD34+. Težji kot je novorojenček, večja je koncentracija CD34+. Pri vaginalnem porodu pa te povezave niso dokazali. Sicer pa način poroda ne vpliva na koncentracijo CD34+ celic.

Sparrow in sod. (2002) so opravili raziskavo, kako vpliva na koncentracijo CD34+ celic in volumen zbrane popkovnične krvi pri vaginalnem porodu odvzem popkovnične krvi, preden se rodi posteljica (*utero*), v primerjavi z odvzemom, ko se posteljica že rodi (*ex utero*). Dokazali so, da odvzem pred porodom ali po porodu posteljice nima nobenega vpliva na volumen odvzete krvi iz popkovnice niti na skupno število CD34+ celic. Nadalje

pa so dokazali, da je volumen zbrane popkovnične krvi pri porodu s carskim rezom večji v primerjavi z vaginalnim porodom. Na koncentracijo CD34+ celic po njihovih raziskavah način poroda nima vpliva.

2.5.2 Neonatalni dejavniki, ki vplivajo na količino popkovnične krvi in število celic v njej

Na večjo koncentracijo celic z jedrom v popkovnični krvi vpliva spol novorojenčka. V krvi novorojenk je bila koncentracija celic z jedrom višja kot pri moških novorojenčkih. Prav tako pa je na večjo koncentracijo celic z jedrom v krvi vplivala gestacijska starost, torej starost ploda. Obratno pa na koncentracijo CD34+ celic v zbrani popkovnični krvi vpliva manjša gestacijska starost. Pri manjši gestacijski starosti je koncentracija CD34+ v zbrani krvi večja, kar nakazuje, da ima mlajši plod več progenitorskih celic v popkovnici, čeprav popkovnična kri vsebuje manj celic z jedrom. Na večjo koncentracijo CD34+ celic pa vpliva tudi večja porodna teža novorojenčka. Večji kot je dojenček, večji bo tudi volumen zbrane popkovnične krvi in posledično bo v popkovnici večjega novorojenčka višje število celic z jedrom in CD34+ celic (Nakagawa in sod., 2004).

Za 500 g višja porodna teža novorojenčka prispeva k višji (za 28 %) koncentraciji CD34+ celic. Vsak dodaten teden gestacijske starosti pa prispeva k za 9 % višji koncentraciji CD34+ celic (Ballen in sod., 2001).

Ballen in sod. (2001) so dokazali tudi, da spol novorojenčka ne vpliva na koncentracijo celic z jedrom. Vendar kot je razvidno iz raziskav, ne velja neko skupno pravilo, kajti George in sod. poročajo o višji koncentraciji CD34+ celic pri moških novorojenčkih. Spol pa naj ne bi imel vpliva na koncentracijo celic z jedrom (Ballen in sod., 2001; George in sod., 2006).

Nadalje so Aroviita in sod. (2005) dokazali, da imajo moški novorojenčki signifikantno višjo koncentracijo CD34+ celic. Prav tako je bilo v popkovnični krvi deklic več celic z jedrom, kar pa lahko pripišemo temu, da so deklice imele v popkovnični krvi večjo koncentracijo nevtrofilcev.

2.6 CD34 IN CD45

CD34 se nahaja na endotelijskih progenitorskih celicah in na hematopoetskih zarodnih celicah. V glavnem se nahaja ravno na hematopoetskih zarodnih celicah. CD34 je antigen, ki je precej podoben glikozilirani strukturi mucina. Gre za močno glikozilirano molekulo. Polipeptidni del je velik približno 40kD (Barnett in sod., 1999).

Da celice CD34+ zaznamo v krvi, moramo uporabiti protitelesa, ki se vežejo na glikozilirane dele molekule. Ker pa je število celic CD34+ v krvi relativno majhno, je pomembno, da uporabimo protitelo, ki je konjugirano s fluorokromom, npr. fikoeritriinom (Sutherland in sod., 1996).

S CD45 je označena skupina transmembranskih glikoproteinov, katere najdemo samo na hematopoetskih celicah. CD45 se nahajajo na vseh zrelih hematopoetskih celicah razen na eritrocitih in trombocitih. CD45 ima tirozin fosfatazno aktivnost (Vozelj, 2000).

CD45 se torej nahajajo tudi na zrelih matičnih celicah, kar je bilo pomembno za našo preiskavo. Z monoklonskim protitelesom CD45, konjugiranim s fluoresceinom izocianatom (FITC) smo označili populacijo levkocitov v popkovnični krvi. Zaradi uporabe monoklonskega protitelesa CD45 lahko tudi določimo uspešnost liziranja eritrocitov (Sutherland in sod., 1996).

Monoklonsko protitelo CD34 »prepozna« antigen (HPCA – human progenitor cell antigen) na človeških progenitorskih celicah. Antigen CD34 je prisoten na hematopoetskih celicah v krvi, popkovnični krvi in kostnem mozgu. Antigen imajo tako pluripotentne kot tudi unipotentne progenitorske celice. Protitelesi CD45 (FITC) in CD34 (PE) sta pridobljena iz miši.

CD45 FITC/ CD34 PE je torej reagent za analizo z dvema barvnima spektroma. Uporablja se za štetje CD34+ celic v popkovnični krvi. S tema reagentoma smo uporabili BD TruCOUNT epruvice (Becton Dickinson) za določanje koncentracije celic CD34+.

2.6.1 Metode za štetje celic CD34+

Prva metoda za štetje celic CD34+ je temeljila na t. i. protokolu Milan-Mulhouse. Protocol je temeljil na merjenju levkocitov na podlagi disperzije svetlobe. V nadaljnjih poskusih določanja absolutnega števila celic CD34+ je bila v uporabi tako imenovana metoda z dvojno platformo. Pri tej metodi se je odstotek celic CD34+ določal glede na levkocite ali celice, ki imajo jedro. Odstotek CD34+ in absolutno število levkocitov ali celic z jedrom se je meril na hematološkem analizatorju. Oba podatka pa sta se uporabljala za izračun števila celic CD34+ (Gajkowska in sod., 2006).

Sedaj pa lahko število celic CD34+ določimo neposredno s pretočno citometrijo. To je tako imenovana metoda z enojno platformo. To nam omogočajo polietilenske kroglice za štetje celic, katerih znano število dodamo v vzorec. V našem primeru pa smo uporabili namenske epruvete, ki že vsebujejo liofiliziran pelet s točno določenim številom kroglic. Razmerje med številom fluorescirajočih zrn in celicami CD34+ je osnova za izračun absolutnega števila celic CD34+ (Gajkowska in sod., 2006).

$$\text{absolutno število CD34+ celic} = \left(\text{število CD34+ celic} \times \text{število fluorescirajočih zrn} \right) \div \text{število dodanih v s} \quad (1)$$

V raziskavah, ki so vključevale uporabo metode z enojno in z dvojno platformo, je bila dokazana zmanjšana varianca pri določanju celic CD34+ (Gratama in sod., 1998).

Vsaka navedena metoda ima svoje prednosti in slabosti, zato se je treba odločiti, katero metodo uporabljamo v odvisnosti od rezultatov, ki jih želimo. Vendar je po splošnem mnenju protokol ISHAGE najbolj natančen, zanesljiv in občutljiv.

V primerjavi med laboratoriji je bilo ugotovljeno tudi, da so laboratoriji, ki uporabljajo protokole z eno platformo (npr. metoda ISHAGE) dosegli najmanjše variacijske koeficiente (Gratama in sod., 1998).

2.6.1.1 ISHAGE

Metoda po ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) je validirana, preprosta, hitra in občutljiva metoda za kvantifikacijo celic CD34+. Najprimernejša je zaradi preproste uporabe v laboratorijih. Procesiranje je hitro in enostavno in ga je možno izvesti z osnovno strojno in programsko opremo za pretočni citometer. Njena natančnost in ponovljivost omogoča, da dobimo klinično pomembne rezultate. Metoda je tudi močno občutljiva, kar je pomembno, ker so hematopoetske celice v krvi zastopane v relativno majhnem številu. S to metodo je mogoče zaznati eno CD34+ celico izmed 10.000 celic. Z uporabo fluorescirajočih monoklonskih protiteles pa je metoda tudi specifična. Zelo pomembno je tudi to, da je metoda hitra. Metoda nam prav tako zagotavlja merjenje števila celic z jedrom (Southerland in sod., 1996).

Na začetku je temeljila na uporabi tribarvnega petparameterskega protokola, kateri je zahteven in dolgotrajen. Vendar je bila ISHAGE metoda razširjena na uporabo ene platforme, na podlagi zrnca za štetje. Z uporabo ene platforme tako neposredno dobimo podatek o številu živih CD34+ v volumski enoti vzorca. Metoda temelji na uporabi dveh protiteles, označenih z različnima fluorescentnima barviloma (CD45-FITC/CD34-PE). S CD45 preverjamo nespecifično vezavo CD34 monoklonskih protiteles. Uporabimo še barvilo 7AAD in lizirni reagent, s katerim liziramo rdeče celice. Lizirni reagent nam omogoča tudi hitrejšo procesiranje vzorca. Za merjenje absolutne koncentracije števila celic CD34+ v vzorcu smo uporabili epruvete BD TruCount, saj je z njimi analiza celotnega števila natančnejša in lažja. Na dnu epruvete je nameščena mrežica, ki preprečuje, da bi polietilenske kroglice padle iz epruvete. Pod to mrežico pa se nahajajo kroglice, ki nam omogočajo natančno analizo celotnega števila CD34+. Kroglica je liofiliziran pelet, ki se tekom priprave preparata raztopi in s tem sprosti znano število fluoresciranih kroglic. Pretočni citometer BD FACSCanto in programska oprema BD FACSDiva, ki smo ju uporabljali pri naših raziskavah, avtomatično izračuna število (Becton Dickinson, 2008).

Po metodi ISHAGE je treba izmeriti najmanj 100 dogodkov celic CD34+ na pretočnem citometru in največ 75.000. V kolikor se odstotek celotnega števila celic CD34+ giblje okrog 0,1 %, pa lahko izmerimo tudi več dogodkov. Ker se v popkovnični krvi odstotek

celotnega števila giblje okrog 0,1 %, smo za našo raziskavo vedno izmerili 100.000 dogodkov. Avtorji metode priporočajo tudi, da se vzorčki obdelajo v duplikatih, zato da lahko določimo odstopanje meritev. V kolikor je ponovljivost 90 % so rezultati zanesljivi (Southerland in sod., 1996).

Tekom naše raziskave smo želeli dokazati tudi ponovljivost rezultatov in s tem preveriti, ali je ponavljanje meritev res potrebno.



Slika 3: Epruveta BD TruCount (Becton Dickinson, 2008: 1)

Število levkocitov v krvi ne sme presežati 30×10^9 levkocitov/L krvi. Če bi bilo večje, je treba vzorec redčiti, da bi dosegli povprečno vrednost 15×10^9 levkocitov/L krvi in s tem preprečili lažno nižje koncentracije. Analiza dogodkov CD34+ s pretočnim citometrom temelji na priporočeni strategiji »gatinga«.

Najprej moramo posneti vse dogodke na pretočnem citometru. Nato moramo izključiti eritrocite in šum, zato zamejimo nadaljnji graf. In preiskujemo samo še levkocite katere s pomočjo gatinga razdelimo na žive in mrtve. Tako dalje preiskujemo samo še limfocite.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA POPKOVNIČNE KRVI ZA ANALIZO NA PRETOČNEM CITOMETRU

V laboratorij smo prejeli epruvete s krvjo. V epruveti je dodan antikoagulant CPD (citrata fosfat dekstroza).

Po metodi A smo iz epruvete z vzorčkom odvzeli 100 µl vzorca in ga prenesli v epruveto BD TruCount. Nato smo dodali 20 µl reagenta BD CD45/CD34. Po dodatku 20 µl reagenta BD CD45/CD34 smo tako pripravljen vzorec na kratko premešali in ga dali inkubirati za 20 minut pri sobni temperaturi v temen prostor.

Po metodi B smo iz epruvete z vzorčkom prav tako odvzeli 100 µl vzorca, vendar smo dodali pol manjši volumen reagenta BD CD45/CD34 kot v primeru metode A. Nato smo tako pripravljen vzorec premešali in dali inkubirati za 20 minut pod enakimi pogoji kot pri metodi A.

Po metodi C smo iz epruvete z vzorčkom odvzeli pol manjši volumen krvi kot v metodi A in B ter dodali enako količino reagenta BD CD45/CD34 kot pri metodi B, torej 10 µl. Tudi tako pripravljen vzorec smo inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru.

Po končani 20-minutni inkubaciji smo rdeče krvne celice v vzorcu lizirali z dodatkom 1 ml amonijevega klorida. Nato smo dodali še 5 µl 7-AAD. Temu sledi še ena inkubacija v temnem prostoru pri sobni temperaturi, tokrat za 15 minut.

Po končani inkubaciji je vzorčke treba pomeriti v roku ene ure na pretočnem citometru. Do merjenja moramo vzorčke shraniti v hladilnik.

V laboratoriju se uporablja pretočni citometer BD FACSCanto. Na računalniku je nameščena programska oprema BD FACSDiva.

Na pretočnem citometru posnamemo 100.000 dogodkov, pri čemer uporabimo protokol ISHAGE.



Slika 4: Pretočni citometer (citometer, voziček s tekočinami in računalnik z LCD-monitorjem) (Becton Dickinson, 2005: 10)

3. 2 ANALIZA CELIC CD34+ S PRETOČNIM CITOMETROM

Vemo, da obstaja veliko različnih matičnih celic, vendar so navadno najdene v zelo majhnih populacijah. V krvi lahko tako potuje 1 matična celica zraven 100.000 drugih celic. Pod mikroskopom so vse celice videti enake, zato je bilo treba ugotoviti, kako bi lahko drugače kvantificirali matične celice.

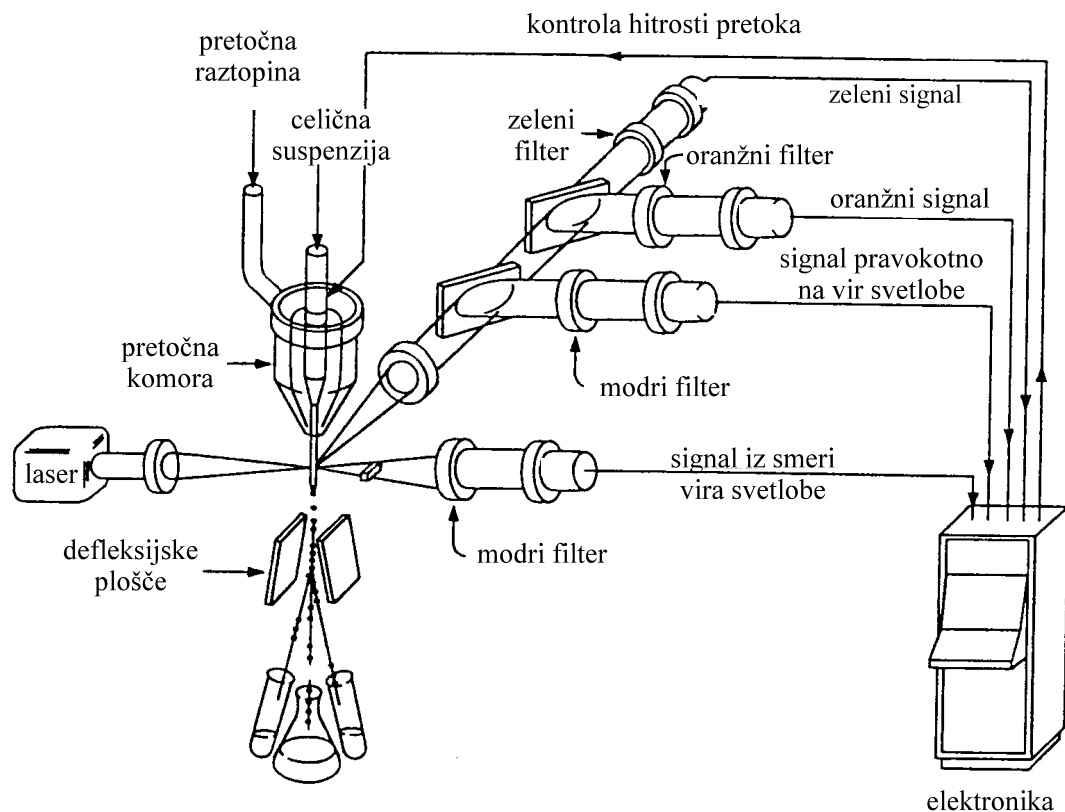
Za kvantifikacijo matičnih celic tako izkoriščamo markerje matičnih celic. To pomeni, da izkoriščamo proteine, ki prekrivajo površino celic in so specifični. To so receptorji, ki imajo zmožnost selektivne vezave monoklonskih protiteles. Obstaja veliko različnih receptorjev, ki se razlikujejo v strukturi in afiniteti. Vsak celični tip matičnih celic ima značilno kombinacijo molekul, katera jih razlikuje od drugih celičnih tipov. V veliko primerih tako potrebujemo več različnih markerjev, da lahko razločimo eno vrsto celic.

Uporabimo markerje, ki skupaj s tarčno celico, torej v kompleksu receptor – monoklonsko protitelo konjugirano s fluorokromom oddajajo svetlobo določene valovne dolžine. Obstajajo različni markerji – fluorokromi, ki se razlikujejo v intenziteti in barvi.

Sledi uporaba pretočnega citometra, ki loči redke celice od milijona drugih celic. Sodobni pretočni citometri so se razvili na osnovi napredovanja laserske in računalniške tehnologije, proizvodnje monoklonskih protiteles in fluorokromov. Pretočni citometer je torej nekakšna nadgradnja fluorescenčnega mikroskopa, kjer je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Omogočeno pa je tudi analiziranje celic, obarvanih z več fluorescenčnimi barvili hkrati. Pri tej metodi suspenzija tarčnih celic pod pritiskom potuje skozi zelo ozko režo v pretočni celici. Ta je tako ozka, da lahko skozi odprtino potuje samo ena celica naenkrat. Ko celica zapusti lijak, potujejo celica ena za drugo in jih pri tem presvetli laser (Kopitar, 2004; Ihan, 1999).

Svetlobni signali, ki imajo enake valovne dolžine kot obsevalna (laserska) svetloba, nastanejo zaradi sipanja svetlobe na celičnih strukturah. Tisti svetlobni signali, ki pa imajo večje valovne dolžine kot obsevalna svetloba, nastanejo zaradi fluorescence. Svetlobo zbirajo različni fotodetektorji. Svetlobni žarek, ki zadane celico se lahko od nje odbije ali pa se lomi, lahko pa se absorbira v različnih fluorescenčnih barvilih, ki fluorescirajo svetlobo druge valovne dolžine. FSC ki sprejema razpršeno svetlobo in meri velikost celic, fotodetektor SSC pa sprejema svetlobo, odbito od celice, katere količina je v skladu z granulacijo in površinsko strukturo. FSC in SSC pa nista edina detektorja, ki prejemata razpršeno svetlobo. Pretočni citometer ima še več fluorescentnih detektorjev, ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Pretočni citometer ima navadno še dva do dvanajst fluorescenčnih fotodetektorjev, ki so opremljeni z barvnimi filtri, s katerimi merimo fluorescentno svetlobo. V detekcijski coni se nahaja sistem leč, ki sprejeto svetlo posredujejo fotopomnoževalkam, katere optične impulze spremenijo v električne, konvertorji pa v končne digitalne impulze (Kopitar, 2004; Ihan, 1999).

Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi grafično prikažemo in tako o vsaki celici dobimo podatke o njeni relativni velikosti, zrnatosti in o vrstah in jakosti oddanih fluorescenčnih signalov. Celice razvrščamo glede na posamezne velikosti. Razvrščanje celic glede na velikost in zrnatost pa nam omogoči ločevanje belih krvnih celic na limfocite, monocite in granulocite. Celice lahko podrobneje razlikujemo z dodatki specifičnih protiteles (Ihan, 1999).



Slika 5: Shematični prikaz pretočnega citometra FACS Calibur (Ihan, 1999:12)

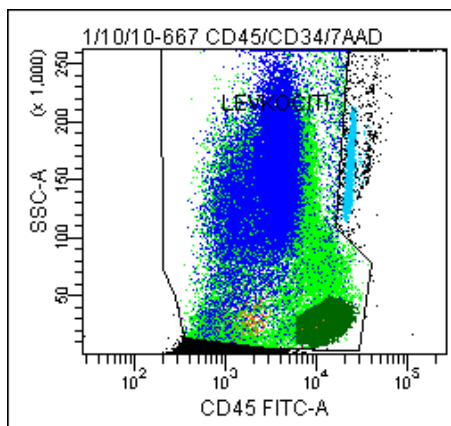
Epruvete BD TruCount smo vstavili v pretočni citometer z uporabo BD FACS loaderja, ki omogoča popolnoma avtomatizirano menjavo in podajanje vzorcev v citometer. Preden smo dali epruvete v loader, smo vsak vzorec premešali.

Rezultati so se prikazali na ekranu v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka na diagramu predstavlja dogodek, ki ga zaznajo različni fotodetektorji. Tako o vsaki celici izvemo velikost, granularnost in fluorescenco. Rezultat pretočne citometrije lahko predstavimo kot odstotek pozitivnih celic ali kot povprečno celično svetilnost. Slednjo uporabljamo, kadar ni mogoče razločiti pozitivne celice od negativnih. Pozitivne celice so celice, ki fluorescirajo po reakciji s fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi. Na X-osi diagrama je prikazana velikost celic. Količina prejete svetlobe je obratno sorazmerna

velikosti celice. Na Y-osi pa je prikazana granuliranost celic. Granuliranost je odraz količine in lastnosti membranskih struktur celice (Kopitar, 2004).

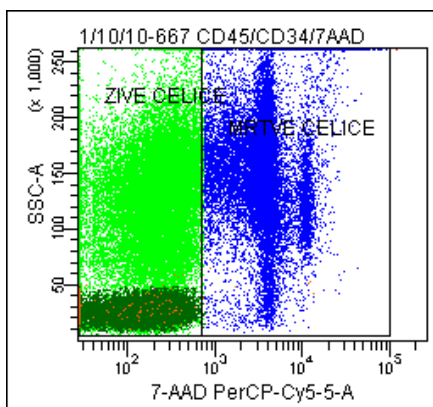
Glede na položaj točk na diagram ločimo posamezne vrste celic.

Pri analizi podatkov smo najprej zamejili levkocite. Posamezne vrste celic namreč ločimo glede na položaj točk v diagramu. Zamejene celice smo opazovali glede na njihovo fluorescenco in računalnik nam je pokazal njihov položaj v obliki točk na novem diagramu.



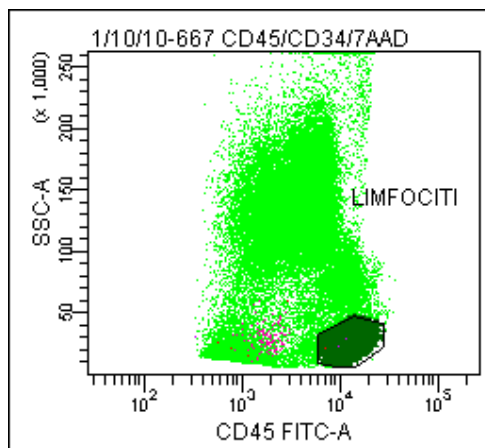
Slika 6: Zamejitev levkocitov

Ko smo omejili levkocite, nas je zanimalo, koliko živih celic je v vzorcu. Zato smo ločili žive levkocite od mrtvih. To nam je omogočil reagent 7AAD. Računalnik nam je rezultate podal v novem grafu.



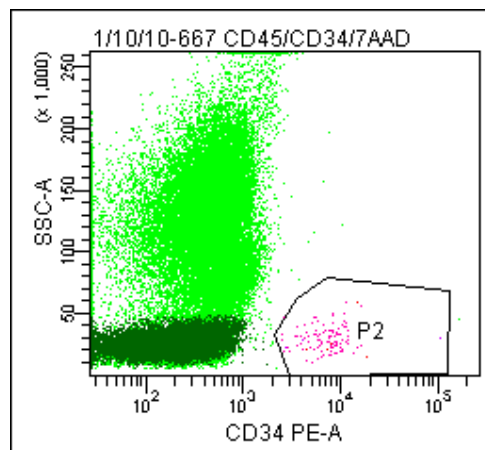
Slika 7: Ločitev živih levkocitov od mrtvih

V nadaljnji analizi so nas zanimale samo žive celice, katere je računalnik prikazal v novem grafu. In tedaj smo lahko omejili limfocite.



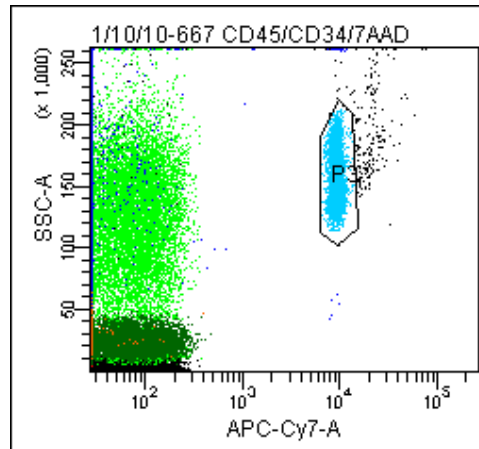
Slika 8: Prikaz vseh živih levkocitov

V skupnem številu vseh levkocitov so nas zanimale samo celice s površinskim antigenom CD34. Torej celice, na katere so se vezala monoklonska protitelesa CD34, konjugirana s fikoeritrinom (PE). Vse celice CD34+ smo razdelili še na žive in mrtve. Tako smo dobili diagram števila vseh živih celic CD34+.



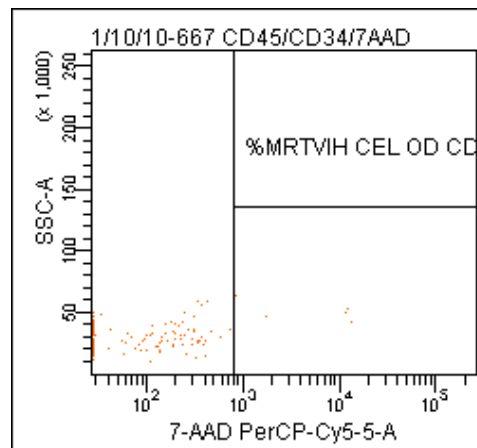
Slika 9: Prikaz števila živih celic CD34+

S pretočnim citometrom in s pomočjo epruvetk BD TruCount smo izmerili tudi absolutno število celic v vzorcu.



Slika 10: Absolutno število celic v vzorcu (P=x)

In na koncu smo določili še procent mrtvih celic CD34+.



Slika 11: Odstotek mrtvih celic CD34+ prikazan desno spodaj

3.3 UPORABLJENI REAGENTI

3.3.1 CD45/CD34

Z reagentom CD45 fluorescein izotiocianat (FITC) smo označili populacijo levkocitov v popkovnični krvi. Antigen CD34 je prisoten na hematopoetskih celicah v krvi, popkovnični krvi in kostnem mozgu. Protitelesi CD45 (FITC) in CD34 (PE) sta pridobljeni iz miši.

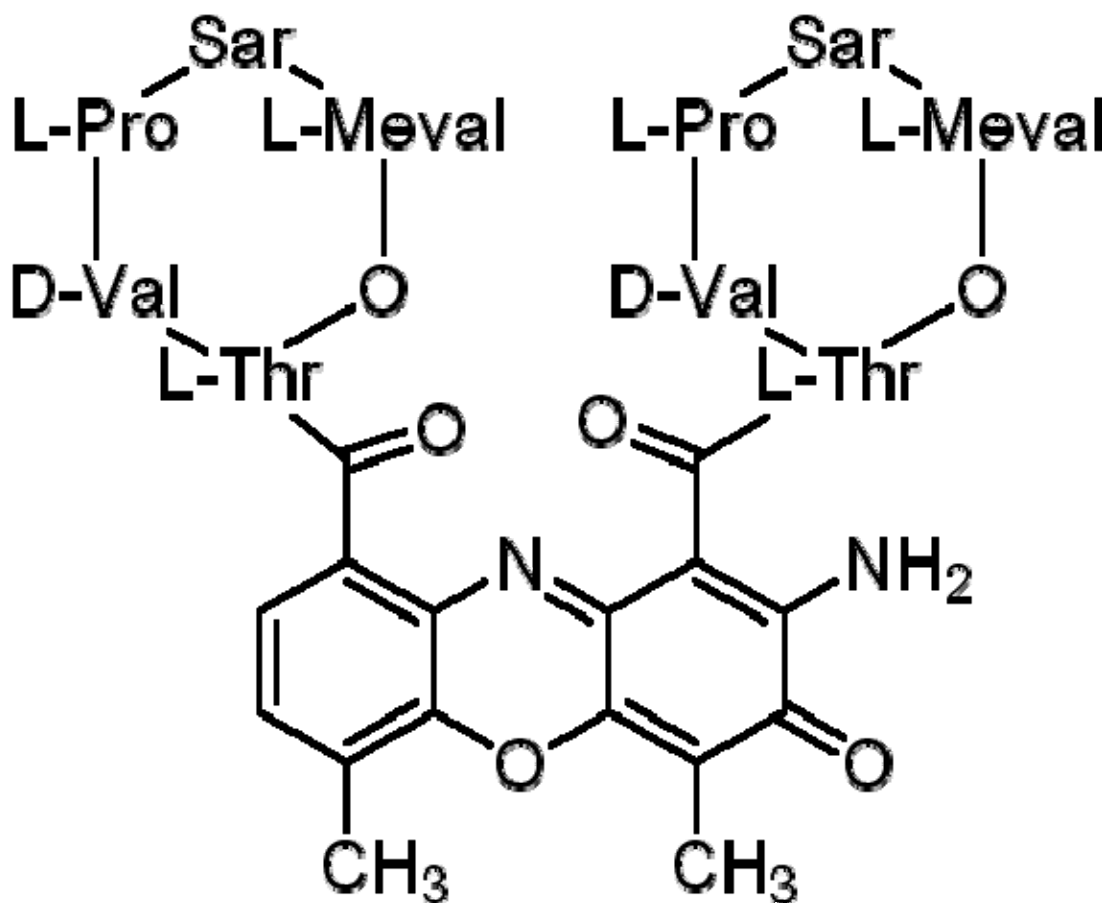
CD45 FITC CD34 PE je torej reagent za analizo z dvema barvnima spektroma, ki se uporablja za štetje celic CD34+ v popkovnični krvi.

3.3.2 7AAD

7-Amino actinomicin D (7AAD) je kemijska zmes, ki fluorescira in ima močno afiniteto do DNK. Je analog aktinomicina D. Aktinomicini so bakteriocidne biološko aktivne spojine. Prvotno so bile izolirane iz askomicetnih gliv iz zemlje. Interkalirajo v dvovijačno DNK, kjer tvorijo stabilne spojine. Ne interkalirajo pa z RNA. 7AAD se uporablja kot fluorescenčni marker za ločevanje mrtvih celic od živih v pretočni citometriji in fluorescenčni mikroskopiji. Njegova prednost v uporabi je ta, da ga lahko uporabimo hkrati s fikoeritinom (phycoerythrin – PE) in fluorescein izocianatom (fluorescein isothiocyanate – FITC) označenimi monoklonskimi protitelesi. 7AAD detektiramo v rdečeoranžnem spektru pri 650 nm. 7AAD je potencialno kancerogen, zato je treba preprečiti stik s kožo in očmi (Schmid, 1992).

V naši preiskavi smo s 7AAD omogočili določanje odstotka viabilnih matičnih celic CD34+ med levkociti (označeni s CD45). 7AAD je prešel v celice s poškodovano membrano in le-te zato svetijo, medtem ko preko nepoškodovane membrane ne more prehajati in zato celice, ki niso mrtve, ne svetijo.

V preiskavi smo uporabili epruvete BD TruCount, zato smo lahko izmerili tudi absolutno koncentracijo celic CD34+ v vzorcu.



Slika 12: Kemijska struktura 7AAD (Merck, 2011: 2)

Vsi reagenti morajo biti shranjeni na temnem v hladilniku pri 4 °C.

3.4 UPORABLJENI VZORCI KRVI

Pri raziskavi smo uporabili 41 vzorcev krvi.

Najprej smo 29 vzorcev smo pripravili za merjenje primerne koncentracije potrebnih monoklonskih protiteles, katera je potrebna za čim boljšo ponovljivost preiskave. Vsak vzorec smo pripravili po metodi A, B in C.

Vzorke smo po metodi A pripravili v dvojnikih, da bi s tem ugotovili ali je metoda dovolj dobro ponovljiva in torej ali je v rutinskem delu laboratorija potrebno meritve izvajati v dvojnikih ali ne.

Dodatna dva vzorca krvi smo uporabili za preverjanje ponovljivosti po metodi A in ponovljivosti po metodi B. Pripravili smo 10 ponovitev po vsaki metodi.

Na koncu naše raziskave smo uporabili še 10 novih vzorcev popkovnične krvi. Ugotavljali smo kako starost vzorca popkovnične krvi vpliva na merjene parametre.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Iz rezultatov poskusov smo izračunali standardne odklone in standardne napake za posamezne parametre. Za analizo ponovljivosti rezultatov smo uporabili Neumann-Keulsov t-test (enoparameterska ANOVA analiza varianc). Testirali smo razlike v variancah. Izbrali smo stopnjo tveganja 0,05, kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05, in ni značilna, če je vrednost p večja od 0,05.

Pri statistični analizi podatkov smo uporabili programsko opremo Microsoft Excel.

4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES

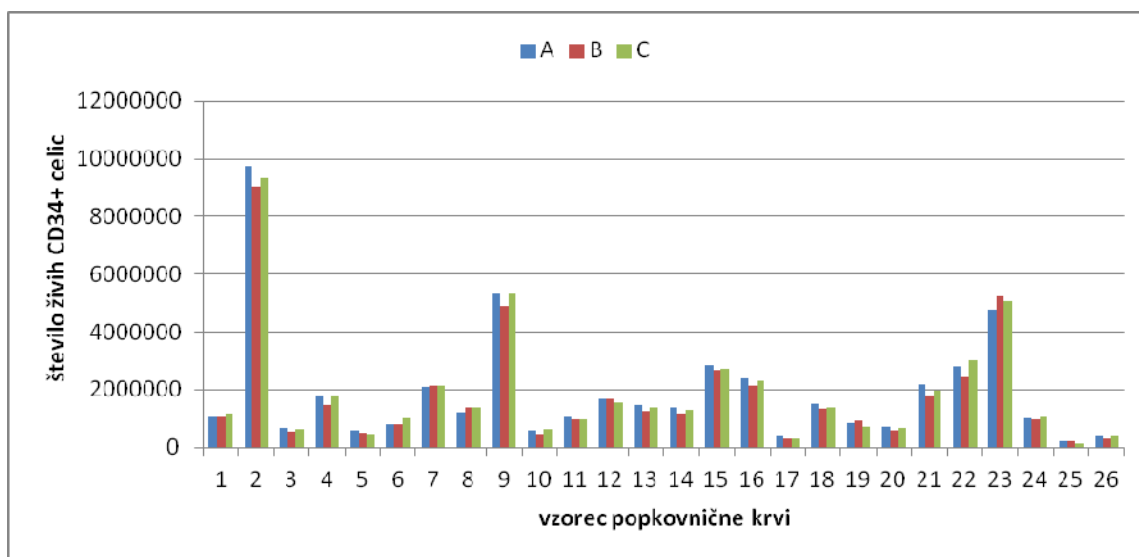
V raziskavi smo preverjali, kolikšna je zadostna oziroma primerna koncentracija monoklonskih protiteles CD34, CD45, s katero lahko še zanesljivo označimo vse matične celice (CD34+) v vzorcu.

V ta namen smo vzorce merili v paralelkah, katerim smo dodajali različne volumne monoklonskih protiteles CD34 in CD45.

Po metodi A smo dali 100 μ l popkovnične krvi, 20 μ l monoklonskih protiteles CD45FITC/CD34PE, 1 ml amonijevega klorida in 5 μ l 7-AAD. Vzorec paralelke A smo naredili v dveh ponovitvah. S tem smo preverili ponovljivost.

Po metodi B smo dali 100 μ l popkovnične krvi, 10 μ l monoklonskih protiteles CD45FITC/CD34PE, 1 ml amonijevega klorida in 5 μ l 7-AAD.

Po metodi C smo dali 50 μ l popkovnične krvi, 10 μ l monoklonskih protiteles CD45FITC/CD34PE, 1 ml amonijevega klorida in 5 μ l 7-AAD.



Slika 13: Rezultati meritev za metodo A, B in C

Iz slike 14 je razvidno, da je metoda B najmanj primerna metoda. Kot najprimernejša se je izkazala metoda A, pri kateri smo vzorcu dodali 20 μ l monoklonskih protiteles.

4.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV

4.2.1 Ponovljivost rezultatov po metodi A in B

Nadalje smo preverjali ponovljivost rezultatov po metodi A in B. Ponovljivost smo preverjali na istem vzorčku zbrane popkovnične krvi. Za vsako metodo smo naredili 10 ponovitev. Izračunali smo standardno deviacijo.

Preglednica 4: Ponovljivost rezultatov po metodi A

Število ponovitev	Število živih celic CD34+ v vzorcu	% mrtvih celic CD34+	% limfocitov	% viabilnosti
1	970082,47	33,5	54,7	89,1
2	972272,98	30,8	55,2	88,8
3	1110466,99	36,2	53,9	89,6
4	1059995,34	31,4	56,4	89
5	931973,94	36,3	57,5	88,8
6	1020619,49	30,3	56,8	89,7
7	851379,29	45,6	58,2	88,8
8	827833,91	33,3	57,3	90,1
9	767853,64	25,5	57,4	90,6
10	968136,15	37,6	56,2	89,8
STDEV	106551,66	5,38	1,37	0,62
STANDARDNA NAPAKA	33694,59	1,70	0,43	0,20

Preglednica 5: Ponovljivost rezultatov po metodi B

Število ponovitev	Število živih celic CD34+ v vzorcu	% mrtvih celic CD34+	% limfocitov	% viabilnosti
1	697782,16	37,9	58,9	88,7
2	775123,58	72,9	58	87,4
3	769051,59	75	57,7	87
4	677939,51	77,6	58,6	86,6
5	700678,69	75,1	57,3	86,3
6	777290,97	73,6	58,2	86,2
7	594562,35	77,7	57,9	85,8
8	677283,90	76,7	58	85,3
9	729038,92	74,7	58,1	85,2
10	671312,38	77,4	53,7	84,9
STDEV	57432,16	12,05	1,45	1,15
STANDARDNA NAPAKA	18161,64	3,81	0,46	0,36

Iz tabele 4 in 5 je razvidno, da so rezultati po metodi A bolj ponovljivi kot po metodi B, kar ponovno pomeni, da je metoda B manj primerna od metode A.

4.2.2 Ponovljivost metode A

Nadalje smo še pri 29 vzorcih preverili ponovljivost metode A. Vsak vzorec smo po metodi A pripravili dvakrat in izmerili koncentracijo matičnih celic.

Preglednica 6: Ponovljivost metode A

V Z O R E C	Št živih celic CD34+ v vzorcju	ODSTOTEK LIMFOCITOV (%)	ODSTOTEK VIABILNOSTI (%)	V Z O R E C	Št živih celic CD34+ v vzorcju	ODSTOTEK LIMFOCITOV (%)	ODSTOTEK VIABILNOSTI (%)
1	10,78	22,2	87,5	1a	11,31	23,8	76,5
2	6,83	36,3	90,9	2a	7,02	36,1	91,3
3	5,71	40,4	82,9	3a	6,39	40,2	82,1
4	7,79	32,8	73,8	4a	8,57	33,1	74,3
5	4,97	40	78,8	5a	6,69	38,8	82,9
6	0,58	41,9	61,8	6a	0,58	42,6	61,6
7	1,46	33,1	40	7a	2,18	32,2	46,7
8	2,83	20,9	52	8a	3,37	23	52,1
9	18,45	23,5	59,8	9a	19,80	26,5	58,2
10	9,80	58	83,3	10a	10,38	58,2	82,2
11	17,01	43,5	71,4	11a	16,94	44,8	71,9
12	14,08	36,2	87,7	12a	13,25	36,3	88,3
13	28,99	46,3	81,8	13a	28,24	46,8	82
14	4,23	34,6	77,3	14a	3,78	35	78
15	14,58	34,2	89,6	15a	13,60	31,5	91
16	14,34	36	84,1	16a	15,70	37,5	82,9
17	8,86	54,8	76,4	17a	8,27	55,1	76,7
18	7,59	35,6	80,1	18a	6,52	37,8	83,5
19	28,22	32,6	87	19a	28,14	32	86,6
20	9,74	26,4	85,6	20a	10,88	25,4	85,6
21	2,05	35	78,8	21a	2,13	33,5	77,4
22	3,69	44,3	88,2	22a	4,42	45,1	88,4
23	4,29	48,4	66,7	23a	3,63	47,8	69,3
24	46,30	45,3	85,6	24a	44,81	46,1	85,4
25	12,60	50,4	82,6	25a	12,78	49,7	82,9
26	8,57	35,2	78,3	26a	7,68	35	78,7
27	8,12	41,4	74,3	27a	8,43	42,3	74,5
28	44,53	45,8	79,7	28a	44,65	46,6	79,6
29	6,69	38,9	70	29a	7,64	38,8	69,7

Preglednica 7: Rezultati ponovljivosti po metodi A

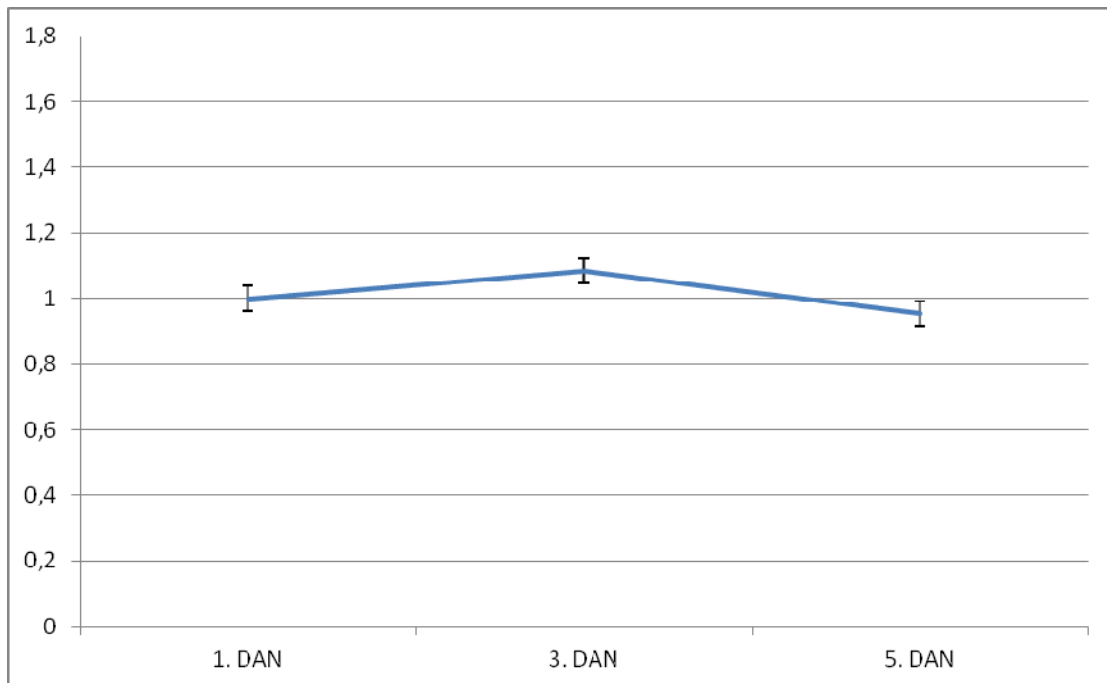
STATISTIKA	Št. živih celic CD34+ v vzorcu	ODSTOTEK LIMFOCITOV	ODSTOTEK VIABILNOSTI
PARNI T-TEST	0,357	0,252	0,773
STANDARDNA NAPAKA	1,483	1,158	1,485

Obe ponovitvi smo primerjali s parnim t-testom in nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Ker so bila odstopanja manjša kot 5 %, menimo, da za vrednotenje števila živih celic CD34+ za namen shranjevanja ni potrebno izvajati testa v dvojniku.

4.3. VPLIV STAROSTI KRVI NA MERJENE PARAMETRE

Preglednica 8: Vpliv starosti krvi na merjene parametre

Številka vzorca	Dan meritve	Število živih celic CD34+ v vzorcu ($\times 10^5/L$)	Odstotek Limfocitov (%)	Odstotek viabilnosti (%)	INDEKS 2. in 3. MERITVE S 1. MERITVIJO	Odstotek odstopanja (%)
1	1	6,93	36,3	91,1		
	3	5,87	42,8	77,8	0,85	15,23
	5	5,80	26,3	65,4	0,84	16,31
2	1	17,85	39,2	95,55		
	3	16,95	47,8	83,5	0,95	5,03
	5	15,06	47,1	72,4	0,84	15,66
3	1	13,67	36,2	88		
	3	12,33	47,6	83,1	0,90	9,77
	5	9,98	36	82,7	0,73	27
4	1	28,62	46,3	81,9		
	3	33,82	53,8	75,4	1,18	-18,17
	5	24,41	38,4	79	0,85	14,71
5	1	14,09	34,2	90,3		
	3	18,38	43,7	81,8	1,30	-30,46
	5	19,06	47,4	81,4	1,35	-35,23
6	1	15,02	36	83,5		
	3	14,03	61,6	64,5	0,93	6,58
	5	12,62	59	56,3	0,84	15,98
7	1	28,18	32,6	86,8		
	3	29,80	35,9	79,8	1,06	-5,73
	5	24,39	37	76,3	0,87	13,47
8	1	47,67	36,1	85,8		
	3	55,05	42,2	82,9	1,15	-15,48
	5	54,62	42,7	82,6	1,15	-14,59
9	1	10,31	26,4	85,6		
	3	12,45	29,7	82,5	1,21	-20,77
	5	9,41	31,1	72,5	0,91	8,70
10	1	9,60	35,2	78,5		
	3	12,53	32,8	78	1,31	-30,62
	5	11,02	38,9	71,8	1,15	-14,86



Slika 14: Povprečno razmerje in standardna napaka med številom živih celic CD34+, merjenih 1. dan, in številom živih celic, izmerjenih 3. in 5. dan

Pričakovali smo, da bo število živih celic CD34+ s časom padalo. V naši raziskavi pa dobljeni rezultati temu deloma nasprotujejo. Število živih celic CD34+ v vzorcih s časom navidezno naraste. Naraščanje je manjše kot 10 %, kar lahko pojasnimo s tem, da najboljčutiljivejše celice, to so granulociti in monociti, hitreje propadajo, število živih celic CD34+ pa ostaja enako. V povprečju je zaradi propadanja granulocitov in tudi monocitov videti, kot da se število matičnih celic povečuje, kar pa ni res.

Povišanje števila živih celic CD34+ bi lahko pripisali tudi temu, da so se celice v epruveti pomnoževale.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Matične celice so zelo pomembne za klinično uporabo, kar so ugotovili že pred petdesetimi leti, ko so s pomočjo krvotvornih matičnih celic pričeli zdraviti različne krvne bolezni. Uporaba pa se je z leti zelo razširila in tako omogočila, da ne zdravimo samo krvnih bolezni, ampak tudi avtoimunske bolezni, dedne metabolne motnje in bolezni imunskega sistema. V prihodnje bo mogoče tudi tkivno inženirstvo in raziskave kažejo, da bo na pomenu pridobilo shranjevanje lastnih matičnih celic za morebitno avtologno transplantacijo. Največji pomen pri tem ima trenutno shranjevanje popkovnične krvi v zasebnih in javnih bankah, saj se v popkovnični krvi nahaja zadostna koncentracija matičnih celic za nadaljnjo uporabo.

Namen našega dela je bila uvedba preiskave kvantifikacije matičnih celic CD34+. Preiskava je namenjena določevanju števila in viabilnosti matičnih celic CD34+ v popkovnični krvi. Preiskava je ključnega pomena za nadaljnje shranjevanje in tudi samo uporabo matičnih celic v klinične namene.

5.1 KONCENTRACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES

V naši raziskavi smo najprej želeli ugotoviti, kolikšna je zadostna koncentracija uporabljenih protiteles za merjenje količine matičnih celic CD34+ v popkovnični krvi. V ta namen smo naredili več meritev, različnih vzorcev v različnih paralelkah. Vsak vzorec popkovnične krvi smo pripravili tako, da smo najprej dodali 20 μ l protiteles, nato smo pripravili vzorec z 10 μ l protiteles, tretji vzorec pa smo pripravili tako, da smo uporabili manjši volumen krvi in 10 μ l protiteles, končna koncentracija pa je bila enaka kot v prvi pripravljeni paralelki.

Ugotovili smo, da je od vseh metod najmanj primerna metoda B, to je metoda, v kateri smo uporabili 100 μ l popkovnične krvi in 10 μ l monoklonskih protiteles. Ta metoda je najmanj primerna, saj je razmerje med popkovnično krvjo in monoklonskimi protitelesi premajhno. Tako metoda ni dovolj natančna, saj pretočni citometer ne izmeri vseh matičnih celic, prisotnih v vzorcu, kajti monoklonskih protiteles je v vzorcu premalo, da bi se lahko vezali na vse matične celice, pretočni citometer pa ne mora zaznati neoznačenih matičnih celic.

Metodi A in C sta primernejši, saj je v tem primeru razmerje med popkovnično krvjo in protitelesi večje, vendar pa zanesljivejše rezultate daje metoda A, v kateri uporabimo večji volumen popkovnične krvi in večji volumen monoklonskih protiteles.

5.2 PONOVLJIVOST REZULTATOV

Nadalje smo preverjali ponovljivost rezultatov, s to primerjavo pa smo lahko še enkrat potrdili, da je metoda A (100 µl popkovnične krvi + 20 µl protiteles) primernejša metoda za klinično uporabo, saj je tudi ponovljivost rezultatov po metodi A večja kot po metodi B. Ponovljivost po metodi A je večja kot ponovljivost rezultatov po metodi B, kar pomeni, da je pri metodi A uporabljeno ravno pravo razmerje in dovolj velik volumen popkovnične krvi, da pretočni citometer lahko natančneje izmeri število živih matičnih celic v popkovnični krvi.

Nadalje smo večje število vzorcev pripravili po metodi A v dvojnikih. S tem smo želeli preveriti, kako dobro ponovljivi so rezultati in ali je potrebno izvajati meritve za namen shranjevanja popkovnične krvi v dvojnikih. Ugotovili smo, da so rezultati zelo dobro ponovljivi, saj je odstopanje med paralelkami manjše od 5 %, in zato ni potrebno izvajati meritev za namen shranjevanja v dvojnikih, kajti po metodi ISHAGE bi morali izvajati meritve v dvojnikih, v kolikor bi ugotovili, da je ponovljivost manj kot 90 %. Ker je ponovljivost več kot 95 %, veljajo rezultati za zanesljive.

5.3 VPLIV ČASA NA MERJENE PARAMETRE

Z našo raziskavo smo dokazali, da čas vpliva na živost matičnih celic v vzorcu, zato je številčno koncentracijo celic CD34⁺ in njihovo viabilnost treba določiti čim prej po dostavi vzorca v laboratorij. V naši hipotezi smo predvidevali, da bo število živih celic CD34⁺ v vzorcu s časom konstantno padalo, vendar nekatere naše meritve temu nasprotujejo.

Število živih CD34⁺ celic s časom v nekaterih vzorih naraste, saj je levkocitna populacija različno občutljiva in ima različno življenjsko dobo. Tako granulociti in monociti živijo v

krvi krajši čas in torej hitreje odmrejo kot limfociti. Do tega fenomena prihaja najbolj ravno v popkovnični krvi, kajti limfocite delimo na limfocite z dolgo življenjsko dobo in na limfocite s kratko življenjsko dobo. Limfociti z dolgo življenjsko dobo izhajajo iz kostnega mozga ali iz timusa, medtem ko limfociti s kratko življenjsko dobo nastajajo v bezgavkah. Kot vemo, pa pri plodu izhajajo limfociti iz kostnega mozga in ne iz bezgavk, kar pomeni, da se v popkovnični krvi nahaja višja koncentracija dolgo živečih limfocitov. Prav tako pa je tudi sama številčna koncentracija levkocitov bistveno višja kot pri odraslih. Pri odraslih orientacijska referenčna vrednost levkocitov znaša $4\text{--}10 \times 10^9/\text{L}$, medtem ko ta pri 12 ur starem otroku znaša kar $13\text{--}38 \times 10^9/\text{L}$. In že po 12 urah, torej pri en dan starem otroku pade na $9,4\text{--}34 \times 10^9/\text{L}$. Pri otroku, starem 7 dni, pa referenčna vrednost levkocitov znaša samo še $5\text{--}21 \times 10^9/\text{L}$. Torej je v otrokovi krvi veliko granulocitov in monocitov, ki pa so občutljive celice in zato hitro in v velikem številu propadejo. S tem pa število živih celic CD34+ navidezno naraste.

Matičnih celic je v popkovnični krvi manj kot 1 %, zato je takšno odstopanje od rezultatov vidno, ampak je minimalno. Koncentracija celic CD34+ navidezno naraste, ker je populacija matičnih celic, ki je sicer zelo majhna, bolj odporna, in matične celice ne propadajo tako hitro kot ostale celice. V kolikor bi vse celice propadale enako hitro, bi koncentracija živih matičnih celic CD34+ bila tretji in peti dan meritve enaka prvemu dnevu meritve, saj bi koncentracije vseh celic enako upadale, volumen vzorčene krvi pa je vsak dan enak, zato bi dobili vsak dan enake koncentracije celic CD34+. Ker monociti in nevtrofilci umirajo hitreje kot celice CD34+, se koncentracija teh celic tretji dan meritve navidezno poveča.

6 POVZETEK

Matične celice imajo sposobnost dolgotrajnega deljenja, samoobnavljanja in celo diferenciacije v bolj usmerjene tkivne celice. Imajo tudi izredno prilagoditveno sposobnost na spremembe in pravimo da so izredno plastične. V določenih primerih so celo sposobne preskočiti iz ene somatske linije v drugo. Zaradi njihovih lastnosti, se dan danes poslužujemo različnih oblik odvzema in shranjevanja matičnih celic, saj lahko pri nekaterih pacientih s presaditvijo dosežemo izjemne rezultate in ozdravitev. Kot standardna terapija se matične celice iz popkovnične krvi namreč že uporabljajo pri rakavih obolenjih kostnega mozga, nekaterih levkemijah, limfomih, nekaterih motnjah imunskega sistema, dednih metabolnih motnjah in motnjah proliferacije krvnih celic. Vendar pa se moramo zavedati tudi določenih omejitev matičnih celic. Težava se namreč pojavi, ko koncentracija matičnih celic, ne zadostuje za uspešno transplantacijo in torej matičnih celic shranjenih npr. iz popkovnične krvi ne moramo uporabiti. V Sloveniji je v tem trenutku najpopularnejše shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi, v privatnih bankah, za morebitno avtologno uporabo.

Absolutno število CD34+ celic je torej pomembne podatek za odločitev o nadaljnjem shranjevanju matičnih celic. Mejna vrednost za shranjevanje v privatni banki je namreč 150.000 živih matičnih celic v celotni popkovnični krvi. Zato je cilj diplomske naloge, ugotoviti kolikšna je najnižja koncentracija monoklonskih protiteles CD34, CD45 s katero lahko še zanesljivo označimo vse matične celice (CD34+), ali je potrebno meritve izvajati v paralelkah in v kolikšnem času po prejemu vzorca v laboratorij je potrebno izvesti analizo koncentracije matičnih celic v vzorcu.

Rezultati so pokazali, da je potrebno številčno koncentracijo CD34+ celic in njihovo viabilnost določiti čim prej po prejemu vzorca v laboratorij. Nadalje so rezultati pokazali, da je najprimernejša dodana koncentracija 20 μ l monoklonskih protiteles CD45FITC/CD34PE na 100 μ l vzorca popkovnične krvi, prav tako pa rezultati kažejo, da je metoda primerna, saj za vrednotenje števila živih celic CD34+ za namen shranjevanja ni potrebno izvajati testov v dvojniki. Glede na rezultate lahko metodo vpeljemo v vsakodnevno določanje absolutnega števila celic CD34+.

7 VIRI

- Andoljšek D. 2005. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Interna medicina. 3. izd. Kocjančič A., Mravlje F., Štajer D. (ur.). Ljubljana, Littera Picta: 1171–1179
- Aroviita P., Teramo K., Hiilesmaa V., Kekomäki R. 2005. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. *Transfusion*, 45, 4: 613–621
- Aroviita P., Teramo K., Hiilesmaa V., Westman P., Kekomäki R. 2004. Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34+ cell concentration. *Acta Paediatrica*, 93, 10: 1323–1329
- Ballen K. K., Wilson M., Wu J., Ceredona A. M., Hsieh C., Stewart F.M., Popovsky M. A. 2001. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation*, 27, 1: 7–14
- Barnett D., Janossy G., Lubenko A., Matutes E., Newland A., Reilly J. T. 1999. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. *Clinical and Laboratory Haematology*, 21, 5: 301–308
- Becton Dickinson. 2005. BD FACSCanto™ Flow Cytometer. San Jose, Becton Dickinson: 12 str.
<http://www.u-picardie.fr/plateforme/icap/images/facs canto.pdf> (3. 10. 2010)
- Becton Dickinson. 2008. BD trucount tubes: the standard for absolute counting for the clinical laboratory. San Jose, Becton Dickinson: 2 str.
http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Trucount_Tubes.pdf (3. 10. 2010)
- Borlongan C. V., Kaneko Y., Maki M., Yu S. J., Ali M., Allickson J. G., Sanberg C. D., Kuzmin - Nichols N., Sanberg P. R. 2010. Menstrual blood cells display stem cell – like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells and Development*, 19, 4: 439–451

Broxmeyer H.E. 2010. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. V: StemBook, Silberstein L.E. (ed.). Harvard, Harvard University, The Stem Cell Research Community: 13 str.
<http://www.stembook.org/node/693> (2. 10. 2010)

Denner L., Bodenbun Y., Zhao J. G., Howe M., Cappo J., Tilton R. G., Copland J. A., Forraz N., McGuckins C., Urban R. 2007. Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Proliferation*, 40, 3: 367–380

Domanović D. 2004. Zbiranje in predelava krvotvornih matičnih celic iz placentalne krvi. V: Zbornik strokovnih prispevkov 6. podiplomskega seminarja zdravljenje s krvjo. Transfuzijska medicina v porodničarstvu, Portorož, 3. in 4. december 2004. Bricl I., Lampreht N. (ur.). Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino: 113–118

Domanović D. 2007. Zgodovina presajanja krvotvornih matičnih celic v Sloveniji in v svetu. V: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic – zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC. 42. strokovni seminar, Zreče 25. in 26. maj 2007. Nunar-Perko A., Gregorc C. (ur.). Ljubljana. Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije – sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji: 12–18

Donaldson C., Armitage W. J., Laundry V., Barron C., Buchanan R., Webster J., Bradley B., Hows J. 1999. Impact of obstetric factors on cord blood donation for transplantation. *British Journal of Hematology*, 106, 1: 128–132

Educell. 2011. Matične celice v tkivih odraslega. Ljubljana, Educell d.o.o.: 2 str.
<http://www.educell.si/raziskave-in-razvoj/razvoj-66044/maticne-celice-v-tkivih-odraslega> (28. 2. 2011)

- Gajkowska A., Oldak T., Jastrzevska M., Machaj E. K., Walewski J., Kraszewska E., Pojda Z. 2006. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44, 1: 53–60
- Gammaitoni L., Weisel K. C., Gunetti M., Wu K. D., Bruno S., Pinelli S., Bonati A., Aglietta M., Moore M. A., Piacibello W. 2004. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood*, 103, 12:4440-4448
- George T. J., Sugrue M. W., George S. N., Wingard J. R. 2006. Factors associated with parameters of engraftment potential of umbilical cord blood. *Transfusion*, 46, 10: 1803–1812
- Gluckman E., Broxmeyer H. E., Auerbach A. D., Friedman H. S., Douglas G. W., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P., Cooper S., English D., Kurtzberg J., Bard J., Boyse E. A. 1989. Hematopoietic reconstruction in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-Identical Sibling. *New England Journal of Medicine*, 321, 17: 1174–1178
- Gratama J. W., Orfao A., Barnett D., Huber A., Janossy G., Johnsen H. E., Keeney M., Marti G. E., Preijers F., Rothe G., Serke S., Sutherland D. R., Van der Schoot C. E., Schmitz G., Papa S. 1998. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry*, 34, 3: 128–142
- Haller M. J., Viener H. L., Wasserfall C., Brusko T., Atkinson M. A., Schatz D. A. 2008. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Experimental Hematology*, 36, 6: 710–715
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed, d. o. o. : 11-13

Kang K. S., Kim S. W., Oh Y. H., Yu J. W., Kim K. Y., Park H. K., Song C. H., Han H. 2005. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Chyotherapy*, 7, 4: 368–373

Koblas T., Harman S. M., Saudek F., 2005. The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Review of Diabetic Studies*, 2, 4: 228–234

Kopitar A.N. 2004. Vpliv bakterijskih antigenskih pripravkov na aktivacijo limfocitov s pomočjo gojenih dendritičnih celice. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 27-29

Levičar N., Motaln H., Lah - Turnšek T. 2009. Matične celice – znanstveni, zdravstveni in podjetniški izziv. Ljubljana, NIB – Center matičnih celic: 7 str.

http://www.nib.si/images/stories/datoteke/maticne_celice/maticne-celice_tlahturnsek.pdf (2. 10. 2010)

Merck. 2011. 129935 Actinomycin D, 7-Amino-. Darmstadt, Merck KGaA: 2 str.

http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en_US/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=1Omb.s1LJB8AAAEWwmEfVhTm&ProductUUID=dG2b.s1OQLcAAAEWmAVwbT54&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAyMAAAEWzdUfVhTI (8. 7. 2011)

Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fischer L. W., Gehron Robey P., Shi S. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10: 5807–5812

Nakagawa R., Watanabe T., Kawano Y., Kanai S., Suzuya H., Kaneko M., Watanabe H., Okamoto Y., Kuroda Y., Nakayama T. 2004. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion*, 44, 2: 262–267

Niehues T., Rocha V., Filipovich A. H., Chan K. W., Porcher R., Michel G., Ortega J. J., Wernet P., Göbel U., Gluckman E., Locatelli F. 2001. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children: a Eurocord analysis. *British Journal of Haematology*, 114, 1: 42–48

Prelec A. 2007. Odvzem popkovnične krvi za pridobivanje krvotvornih matičnih celic. V: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic – zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC. 42. strokovni seminar, Zreče 25. in 26. maj 2007. Nunar-Perko A., Gregorc C. (ur.). Ljubljana, Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije – sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji: 129–132

Reboredo N. M., Diaz A., Castro A., Villaescusa R. G. 2000. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 26, 12: 1263–1270

Rebulla P., Lecchi L. 2007. Cord blood banking and accreditation. *ISBT Science Series*, 2, 1: 91–95

Reimann V., Creutzig U., Kögler G. 2009. Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106, 50: 831–836

Rožman P., Jež M. 2009. Matična celica in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s

celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) - Slovar. Ljubljana, Društvo za celično

in tkivno inženirstvo Slovenije: 29 str.

http://www.dctis.org/terminoloski_koticek/slovar.pdf (18. 1. 2011)

- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost: genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4. in 5. oktober 2007. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M. (ur.). Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 202–212
- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. 1995. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 22: 10119-10122
- Sanberg P. R., Willing A. E., Garbuzova-Davis S., Saporta S., Liu G., Sanberg C. D., Bickford P. C., Klasko S. K., El-Badri N. S. 2005. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049: 67-83
- Schmid I., Krall W. J., Uittenbogaart C. H., Braun J., Giorgi J. V. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 13, 2: 204–208
- Sparrow R. L., Cauchi J. A., Ramadi L. T., Waugh C. M., Kirkland M. A. 2002. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion*, 42, 2: 210–215
- Staba S. L., Escolar M. L., Poe M., Kim Y., Martin P. L., Szabolcs P., Allison-Thacker J., Wood S., Wenger D. A., Rubinstein P., Hopwood J. J., Krivit W., Kurtzberg J. 2004. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *New England Journal of Medicine*, 350, 19: 1960–1969
- Sutherland D. R., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I. 1996. The ISHAGE Guidelines for CD34+ determination by flow cytometry. *Journal of Hematotherapy*, 5, 3: 213–226

Tonejc M. 2007. Delovanje slovenskega registra prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC, Slovenija – donor. V: Pridobivanje krvotvornih matičnih celic – zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC. 42. strokovni seminar, Zreče 25. in 26. maj 2007. Nunar-Perko A., Gregorc C. (ur.). Ljubljana, Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije – sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji: 23–29

Urciuoli P., Passeri S., Ceccarelli F., Luchetti B., Paolicchi A., Lapi S., Nocchi F., Lamanna R., Iorio M., Vanacore R., Mazzoni A., Scatena F. 2010. Pre-birth selection of umbilical cord blood donors. *Blood Transfusion*, 8, 1: 36–43

Verter F. 2011. Diseases treated by blood stem cells. Maryland, Parent's Guide to Cord Blood Foundation: 9 str.

<http://parentsguidecordblood.org/content/usa/medical/diseases.shtml?navid=35>

(6. 1. 2011)

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 23–37

Wang F. R., Huang X. J., Zhang Y. C., Chen Y. H., Lu D. P. 2005. Successful transplantation of single unit umbilical-cord blood from unrelated donors in high risk leukemia with a long follow-up. *Chinese Medical Journal*, 118, 9: 772–776

Winslow T., Duckwall C. 2001. Stem cells: scientific progress and future research directions. Washington, Department of Health and Human Services: 222 str.

[http://stemcells.nih.gov/NR/exeres/3E41E0AE-C73C-4842-ADE8-](http://stemcells.nih.gov/NR/exeres/3E41E0AE-C73C-4842-ADE8-83A17CD7563B,frameless.htm?NRMODE=Published)

[83A17CD7563B,frameless.htm?NRMODE=Published](http://stemcells.nih.gov/NR/exeres/3E41E0AE-C73C-4842-ADE8-83A17CD7563B,frameless.htm?NRMODE=Published) (30.09.2010)

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem zaposlenim v laboratoriju za pretočno citometrijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki so mi pomagali pri diplomskem delu.

Hvala prof. dr. Alojzu Ihanu za mentorstvo.

Somentorici in delovni mentorici, dr. Andreji Nataši Kopitar se najlepše zahvaljujem za potrpežljivost pri uvajanju v laboratorij, za organizacijo raziskovalnega dela, za zaupanje, spodbude, razlage, napotke, pomoč in popravke pri izdelavi diplomske naloge.

Moja zahvala gre tudi recenzentu prof. dr. Vladimiru Kotniku.

Hvala tudi BPK (Biobanka popkovnične krvi, Biobanka d.o.o.) za vzorce popkovnične krvi.

Najlepša hvala tudi moji družini, ki mi je študij in izdelavo diplomske naloge omogočila, mi ves čas skupaj s prijatelji stala ob strani, me vzpodbujala in zaupala vame.

»Sreča je srečati prave ljudi, ki v tebi pustijo dobre sledi.«

(T. Pavček)