

Wpływ pH i $p\text{CO}_2$ krwi pępowinowej uzyskiwanej okołoporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych

The influence of pH and $p\text{CO}_2$ levels of umbilical cord blood obtained perinatally on selected parameters of stem cells

Rafał Stojko¹, Cecylia Jendyk², Agnieszka Drosdzol-Cop¹, Marcin Sadłocha¹,
Agnieszka Nowak-Brzezińska³, Dariusz Boruczkowski⁴, Tomasz Ołdak⁴

¹ Katedra Zdrowia Kobiety Wydziału Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, Polska

² Oddział Ginekologiczno-Położniczy z Pododdziałem Ginekologii Onkologicznej, Szpital Zakonu Bonifratrów pw. Aniołów Stróżów w Katowicach, Katowice, Polska

³ Instytut Informatyki, Zakład Systemów informatycznych, Uniwersytet Śląski, Sosnowiec, Polska

⁴ Polski Bank Komórek Macierzystych, Warszawa, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem badania było wykazanie korelacji pomiędzy poziomem pH i $p\text{CO}_2$ krwi pępowinowej pobieranej od dawców, a jakością pozyskanego materiału. Dodatkowo postanowiono znaleźć zależność wpływu pH i $p\text{CO}_2$ krwi pępowinowej na ilość komórek CD34+, ich żywotność oraz wpływ sposobu zakończenia ciąży na właściwości krwi pępowinowej.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 50 ciężarnych kobiet, u których wystąpił poród siłami natury lub elektryczne cięcie cesarskie w terminie porodu. Krew pępowinowa została pobrana bezpośrednio po urodzeniu noworodka. Próbkę poddano analizie w Polskim Banku Komórek Macierzystych w Warszawie.

Wyniki: Przy liczbie leukocytów powyżej 12 tys./ μl i jednoczesnym pH $>7,3$ ilość CD34+ mieściła się w przedziale 0,1-0,2. W przypadku gdy pH wynosi 7,35-7,40 zakres wartości CD34+ wyniósł 0,3-0,4. Największą ilość CD34+ uzyskano dla pH 7,30-7,35 i wynosiła ona 0,4-0,5. Badając żywotność komórek macierzystych, jej największy poziom $>98\%$ uzyskano gdy pH wyniosło poniżej 7,3 oraz gdy pH było $\geq 7,4$. Badania wykazały, że żywotność komórek macierzystych obniżała się do 97-98% przy pH 7,3-7,4. Zaobserwowano niskie wartości CD34+ (0,01-0,09) przy wartościach $p\text{CO}_2 >40,0$ mmHg. Przy $p\text{CO}_2 <38$ mmHg wartość CD34+ wynosiła 0,2-0,3, czyli stosunkowo wysoko. Natomiast przy $p\text{CO}_2 \geq 38$ mmHg ilość CD34+ zawiera się w przedziale 0,1-0,2%.

Wnioski: Żywotność komórek macierzystych krwi pępowinowej wzrasta wraz ze spadkiem pH i $p\text{CO}_2$. Sposób ukończenia ciąży nie wpływa istotnie na żywotność komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste / krew pępowinowa / cięcie cesarskie / poród /

Adres do korespondencji:

Agnieszka Drosdzol-Cop
Katedra Zdrowia Kobiety Wydziału Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 12; 40-752 Katowice, Polska
tel./fax: 322088751
e-mail: cor111@poczta.onet.pl

Otrzymano: 14.01.2014
Zaakceptowano do druku: 02.03.2014

Rafał Stojko et al. Wpływ pH i pCO_2 krwi pępowinowej uzyskiwanej okoloporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych.

Abstract

Objective: The aim of the study was to demonstrate a correlation between pH and pCO_2 levels in umbilical cord blood and the quality of the harvested material. Additionally, the effect of pH and pCO_2 on the number of cord blood CD34+ cells and their vitality was analyzed.

Material and methods: The study included 50 pregnant women after vaginal delivery at term or elective cesarean section. Umbilical cord blood was collected immediately after birth. The probes were analyzed at the Polish Stem Cell Bank in Warsaw.

Results: The number of CD34+ cells ranged from 0.1-0.2 in white blood cells count over 12 thousand/ml and pH of >7.3 . If pH ranged between 7.35-7.40, the number of CD34+ was 0.3-0.4. The highest number of CD34+ cells was noted for pH of 7.30-7.35 and amounted to 0.4-0.5. Analysis of stem cell vitality showed that the highest level, over 98%, was obtained when pH was <7.3 and ≥ 7.4 . The study revealed the viability of stem cells to drop to 97-98% at pH level of 7.3-7.4. Low values of CD34+ (0.01-0.09) were related to pCO_2 of >40.0 mmHg. For $pCO_2 < 38$ mmHg, the value of CD34+ cells was 0.2-0.3%, which is relatively high. However, when pCO_2 was ≥ 38 mmHg, the number of CD34+ ranged between 0.1-0.2.

Conclusions: Viability of the umbilical cord stem cells increases along with the decrease of pH and pCO_2 levels. The mode of delivery does not influence the viability of the stem cells.

Key words: **stem cells / cord blood / cesarean section / delivery /**

Wstęp

Komórka macierzysta (KM) fascynuje świat naukowy od połowy ubiegłego stulecia, a zainteresowanie możliwościami i zastosowaniem jakie niesie z sobą ciągle wzrasta. W roku 2010 zespół ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego wydał opinię na temat „Pobierania i deponowania komórek macierzystych krwi pępowinowej”, która wspiera ideę pobierania i deponowania krwi pępowinowej (KP) w wyspecjalizowanych bankach w celach medycznych [1].

11 września 2012 roku Parlament Europejski w odpowiedzi na znaczny rozwój dziedziny badań nad krwią pępowinową wydał rezolucję w sprawie dobrowolnego honorowego dawstwa tkanek i komórek. Zwrócił się do Państw Członkowskich o wprowadzenie regulacji prawnych dotyczących sektora prywatnego i publicznego bankowania KP i rozpowszechnienia dostępności KM krwi pępowinowej oraz dostępności rzetelnych i obiektywnych informacji związanych z dawstwem KP przy porodzie, procesem bankowania oraz możliwościami wykorzystania autologicznego i heterologicznego pobranego materiału lub dla celów badawczych. Ponadto rezolucja kładzie duży nacisk na wzajemną współpracę banków publicznych i prywatnych w celu zwiększenia dostępności i wymiany na szczeblu krajowym, ogólnoeuropejskim i międzynarodowym próbek KP i tkanek [2].

Idea publicznego „bankowania” KP od 2011 roku zyskuje coraz większe zainteresowanie. Corocznie organizowane są Dni Krwi Pępowinowej. Materiały pobierane od dawców różnią się od siebie pod względem jakościowym, dlatego trudno uzyskać materiał uniwersalny (idealny). W dalszym ciągu trwają poszukiwania markerów, na podstawie których byłaby możliwa wstępna ocena jakościowa pobieranej KP [3, 4].

Krew przeznaczona do przechowywania badana jest pod kątem ilości komórek jądrzastych, ilości komórek CD34+ i ich żywotności. Dane te określają właściwości transplantacyjne danej próbki krwi. W publicznych bankach krwi pępowinowej wykonywane

jest także typowanie każdej próbki w zakresie układu antygenów zgodności tkankowej HLA (ang. *human leukocyte antigen*) [1]. Preparatyka próbki krwi pępowinowej ma na celu zmniejszenie jej objętości przez stosowanie wirowania w gradiencie stężeń lub przez metodę sedymentacji z użyciem HES (hydroksyetyloskrobii). Zawiesina komórek przed zamrożeniem mieszana jest z krioprotektorem i schładzana do temperatury $-80^{\circ}C$ w urządzeniu do kontrolowanego mrożenia, a następnie mrożona w kriostatatach w temperaturze od $-125^{\circ}C$ do $-196^{\circ}C$. Dane na temat transplantologii potwierdzają przydatność tak przechowywanego preparatu nawet po 15-24 latach [5, 6, 7].

Wykorzystanie wyników gazometrycznych krwi pępowinowej do oceny stanu noworodka ma kluczowe znaczenie dla określenia jego dobrostanu po urodzeniu. Wielu autorów jest zgodnych, że wartością graniczną pH, poniżej której przyjmuje się niedotlenienie płodu jest $pH \leq 7,1$ [8].

Doniesienia naukowe z zakresu wartości gazometrycznych krwi pępowinowej w korelacji ze sposobem ukończenia ciąży są niejednoznaczne [9, 10].

Obecnie bierze się pod uwagę wiele czynników mogących wpływać na jakość pozyskanego materiału. Między innymi rozważa się: czas przechowywania krwi, czasy preparatyki, rodzaj użytego antykoagulantu, czy wiek pacjentek przystępujących do „bankowania” [11].

Cel pracy

Nadrzędnym celem pracy była ocena zależności pomiędzy parametrami biofizycznymi (pH i pCO_2) krwi pępowinowej a jakością uzyskanych KM. Dodatkowo określano również poziom pH i pCO_2 krwi pępowinowej w korelacji z liczbą komórek CD34+, leukocytów (WBC) oraz stopniem żywotności KM. Oceniano również zależność między sposobem ukończenia ciąży a właściwościami uzyskanego materiału.

Materiał i metody

Populacja badana

Badaniem objęto 50 ciężarnych kobiet hospitalizowanych w Oddziale Ginekologiczno-Położniczym z Pododdziałem Ginekologii Onkologicznej Szpitala Zakonu Bonifratrów w Katowicach w okresie od lutego do września 2012 roku, u których wystąpił poród siłami natury (PSN) w terminie porodu lub elektywne cięcie cesarskie (CC). W badaniu brały udział pacjentki zdrowe w przedziale wiekowym pomiędzy 18 a 38 rokiem życia, u których podczas obecnej ciąży nie stwierdzono odchylenia stanu zdrowia. Kryterium włączenia stanowiła świadoma zgoda pacjentki na uczestniczenie w projekcie badawczym zgodna z protokołem aprobowanym przez Komisję Bioetyczną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego.

Z spośród 50 pacjentek, 34 pacjentki urodziły drogami natury bez powikłań (68%), natomiast u 16 pacjentek wykonano elektywne CC przed wystąpieniem samoczynnej czynności skurczowej macicy (32%).

Metody badań

Krew pępowinowa została pobrana bezpośrednio po urodzeniu, zaklepowaniu i odpięciu noworodka, zarówno po porodzie fizjologicznym, jak i w przypadku CC. Cała procedura pobierania krwi odbywała się przed zakończeniem trzeciego okresu porodu. Materiał został pobrany poprzez nakłucie naczyń żylnych pępowiny do pojemnika zawierającego antykoagulant CPD (z ang. *Citrate Phosphate Dextrose Solution*) w ilości ok. 1-2ml. Probówki umieszczone zostały w specjalnych żelach stabilizujących i przetransportowane (w ciągu 24h) do laboratorium Polskiego Banku Komórek Macierzystych w Warszawie w temperaturze pokojowej. Preparatyka krwi pępowinowej polegała na redukcji objętości pozyskanej krwi pępowinowej poprzez eliminację erytrocytów i części autologicznego osocza. Eliminację erytrocytów uzyskiwano dzięki ich sedymentacji w środowisku hydroksyetylowanej skrobi (HES 6% solution, Grifols), osocze eliminowano poprzez wirowanie supernatantu (625 x g, 15 minut, 20°C).

Liczbę komórek jądrazstych oceniano na podstawie wyników badań próbek w analizatorze hematologicznym MICROS 60 (Horiba ABX). Ocenę przeprowadzono dwukrotnie: przed rozpoczęciem preparatyki i po jej zakończeniu. Na podstawie tych dwóch odczytów określano procentowy odzysk komórek.

Żywotność komórek oceniano w preparacie krwi pępowinowej na podstawie poziomu fluorescencji komórek wyznakowanych 7-AAD (Via Probe, BD) zgodnie z zaleceniami producenta. Po znakowaniu komórki analizowano za pomocą zestawu do cytometrii przepływowej (FACSCalibur, program CellQUEST Pro, BD).

Liczbę komórek o fenotypie CD 34+ i CD45+ oznaczono po wyznakowaniu zawiesiny komórek przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fikoerytryną (PE) skierowanymi przeciwko antygenom HPCA-2 oraz przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluoresceiną (FITC) skierowanymi przeciwko antygenowi CD45. Kontrolę izotopową stanowiły komórki wyznakowane odpowiednimi przeciwciałami poliklonalnymi. Odsetek komórek krwiotwórczych określono po analizie cytometrycznej. Całkowitą liczbę komórek krwiotwórczych oznaczono na podstawie odsetka tych komórek oraz liczby komórek jądrazstych wyznaczonej za pomocą analizatora hematologicznego.

Drugą frakcję krwi pępowinowej pobrano do specjalnej heparynizowanej strzykawki w ilości ok. 0,5 ml i oznaczono parametry równowagi kwasowo-zasadowej (pH i $p\text{CO}_2$) w przeciągu 5 min przy pomocy pH-metru Cobas 121.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki opracowano przy pomocy narzędzia Excel pakietu MS Office oraz korzystając z oprogramowania Statistica PL. W analizie statystycznej zebranego materiału zastosowano metody opisowe, graficzne (w postaci wykresów) oraz metody wnioskowania statystycznego. Za wartość przeciętną przyjęto średnią arytmetyczną, za miarę rozrzutu – odchylenie standardowe (SD). Spośród metod wnioskowania statystycznego wybrano analizę wariancji (ANOVA). Dodatkowo przeprowadzono eksplorację danych z wykorzystaniem drzew decyzyjnych i analizy skupień za pomocą darmowego pakietu R. Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0,05$ [12, 13].

Wyniki

W analizie pobranej krwi pępowinowej średnia żywotność KM kształtowała się na poziomie 97,15. Najniższą wartość odnotowano u pacjentek po PSN i wynosiła 86,71; najwyższą – 99,88 uzyskano w próbce krwi pobranej od pacjentek po CC, przy pH równym 7,25. W 48% KM miały najwyższą żywotność (>98), a w 20%, w każdej grupie, uzyskano żywotność komórek w przedziale 95-97 oraz 97-98. Tylko w 10% żywotność KM mieściła się w przedziale 90-95, a jedynie w 2% <90 .

Biorąc pod uwagę ilość komórek CD34+, można było zauważyć, że u 8% pacjentek ilość CD34+ spadła poniżej 0,1. W przeważającej większości przypadków (82%) liczba CD34+ mieściła się w przedziale 0,1-0,5. Ilość CD34+ powyżej 0,5 zaobserwowano jedynie u 10% pacjentek.

W badanym materiale tylko u 20% pacjentek liczba WBC mieściła się w granicach przyjętych za normę (4-10 tys./ μl), a odsetek 80% klasował się powyżej 10 tys./ μl . Średnia wartość WBC w materiale własnym wynosiła 13,84 tys./ μl (minimalna - 7,8 tys./ μl , a maksymalna – 27,20 tys./ μl). U większości pacjentek (78%) liczba WBC nie przekroczyła wartości 16,20 tys./ μl .

W następnej kolejności przeanalizowano jak rozkładały się proporcje przedziałów WBC u pacjentek rodzących PSN i przez CC. U 89% pacjentek, u których WBC wynosiło >15 tys./ μl , ciążę zakończono PSN, a jedynie u 11% przez CC. Większość pacjentek (63%) z WBC w przedziale 10-15 tys./ μl urodziło siłami natury, zaś przy WBC w normie (4-10 tys./ μl) większość (60%) urodziła poprzez CC. (Rycina 1).

W pracy oceniano również wpływ poziomu pH i $p\text{CO}_2$ na liczbę WBC. U pacjentek, u których uzyskano wynik $p\text{CO}_2$ w granicach normy, w znaczącej większości (76%) poziomy WBC przekraczały normę: w 44 % WBC >15 tys./ μl , w 32% WBC w przedziale 10-15 tys./ μl . Jedynie u 24% pacjentek uzyskano wynik WBC w granicach normy (4-10 tys./ μl). U pacjentek z $p\text{CO}_2 < 35$ mmHg liczebność WBC w 78% mieściła się w przedziale 10-15 tys./ μl , natomiast w 22% – WBC >15 tys./ μl . (Tabela I).

Drugim badanym parametrem był poziom pH. W 70% pobranych próbek KP oznaczono pH w granicach 7,40-7,29, oznaczających dobrostan płodu. W 12% pH wahało się w granicach 7,25-7,21 (może świadczyć o niewielkiej kwasicy). W przypadku PSN pH zawierało się w granicy 7,25-7,24 (3 przypadki). W tej grupie najniższą wartość stanowiła próbka krwi pępowinowej

Rafał Stojko et al. Wpływ pH i pCO_2 krwi pępowinowej uzyskiwanej okoloporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych.

pobrana w trakcie CC, gdzie pH wyniosło 7,21. 8% pobranych próbek osiągnęło pH w granicach 7,41-7,48, w tym najwyższy poziom pH ($pH=7,48$) odnotowano w przypadku CC. Natomiast w przypadku PSN pH w tej grupie wahało się od 7,41 do 7,43. 6% pacjentek miało pH krwi pępowinowej w granicach 7,28-7,26, gdzie po PSN (2 przypadki) pH wynosiło 7,28 - 7,27. W dwóch przypadkach po PSN pH miało wartość 7,18 i 7,16. Nie miało to jednak wpływu na stan pourodzeniowy noworodka czy przedłużoną hospitalizację. Średnia wartość pH w badanym materiale osiągnęła 7,33, minimalna to 7,16, zaś maksymalna wartość 7,48.

Sprawdzono jak rozkłada się liczebność WBC w zależności od poziomu pH. Zauważono, że dla pacjentek z pH w przedziale 7,2-7,3 WBC zawsze przekraczała normę 10 tys./ μ l. Tyle samo było pacjentek z pH 7,3-7,4, które miały WBC w granicach normy (48%) i powyżej (52% w tym 30% WBC 10-15 tys./ μ l oraz 22% WBC >15 tys./ μ l). Wśród pacjentek z pH >7,4 wszystkie osiągnęły WBC powyżej normy, przy czym dokładnie taka sama była ilość próbek z WBC w przedziale 10-15 tys./ μ l i >15 tys./ μ l.

Inny wynik uzyskano dla pacjentek z pH poniżej 7,2. Tutaj równo po 50% podzielona została grupa badana z WBC w normie jak i powyżej normy (>15 tys./ μ l). (Rycina 2).

Określono rozkład liczebności komórek CD34+ w zależności od pH w przedziałach: <7,2, 7,2-7,3, 7,3-7,4 i >7,4. W badanych próbkach krwi pępowinowej, gdzie pH <7,2-50% stanowiły próbki o wartości CD34+ granicach 0,1-0,3, a drugą połowę CD34+ powyżej 0,5. Większość próbek (91%) w grupie pH 7,2-7,3 zawierała ilościowo CD34+ w przedziale 0,1-0,3. U pacjentek z pH w przedziale 7,3-7,4 po 27% stanowiły te z wartością CD34+ poniżej 0,1, na poziomie 0,1-0,3 jak i 0,3-0,5. CD34+ nie mniejsze niż 0,5 zdiagnozowano jedynie u 20% pacjentek. Ostatnią grupę stanowiły pacjentki z pH >7,4; tutaj u większości (60%) liczebność CD34+ utrzymywała się na poziomie 0,1-0,3. Pozostałe 40% stanowiły pacjentki z CD34+ nie mniejszym niż 0,3. (Rycina 3).

W pobranej krwi pępowinowej oznaczono wartości pCO_2 , żeby w dalszej części pracy określić korelację między pCO_2 , a żywotnością KM oraz ilością komórek CD34+. Obserwując wyniki, stwierdzono, że: 50% pacjentek miało wynik pCO_2 w granicach normy (35,0-45,0), 18% – pCO_2 <35mmHg, a 32% – pCO_2 >45mmHg. Średnia wartość pCO_2 wyniosła 42,17mmHg, najniższa kształtowała się na poziomie 28mmHg i uzyskana została po PSN; najwyższa wartość pCO_2 wynosiła 63,3mmHg. U pacjentek z pCO_2 poniżej normy, aż 67% uzyskało najwyższą żywotność KM (>98), natomiast u 22% – żywotność KM w przedziale 97-98. W 11% próbek odnotowano żywotność 95-97. W przypadku, gdy wartość pCO_2 zawierała się w przedziale 35-45mmHg zauważono, że w 36% żywotność KM wynosiła powyżej 98, w 28% – w przedziale 95-97, a w 20% – w przedziale 97-98, w 12% – w przedziale 90-95, a tylko w 4% – poniżej 90.

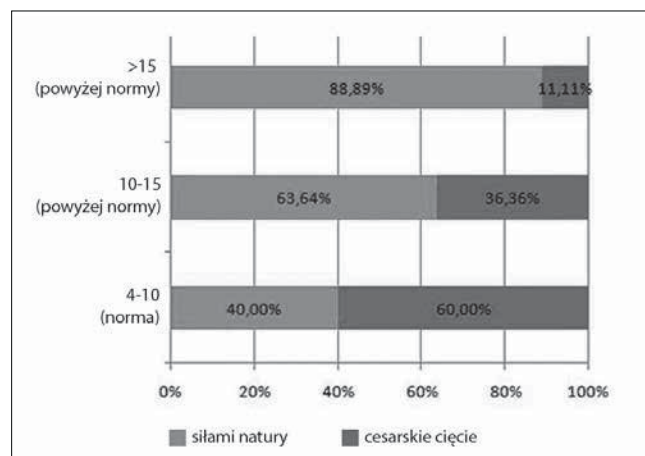
Zaobserwowano, że gdy pCO_2 zawierało się powyżej normy, 56% próbek miało najwyższą żywotność KM (>98), 19% – na poziomie 97-98, a po 13% – żywotność KM w przedziałach 95-97 oraz 90-95. (Rycina 4).

Przeanalizowano także wpływ wartości pCO_2 na ilość komórek CD34+. U pacjentek z pCO_2 poniżej normy, w 78% CD34+ mieściło się w przedziale 0,1-0,3, a po 11% w przedziałach 0,3-0,5 oraz >0,5.

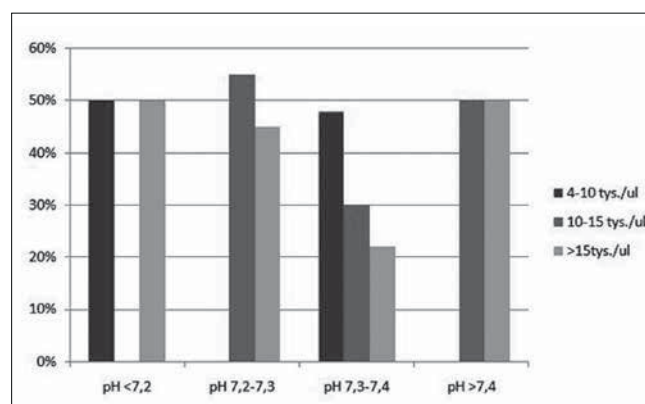
Nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy żywotnością KM, jak i ilością komórek CD34+ a poziomem pH,

Tabela 1. Odsetek wyników otrzymanych w określonych przedziałach wartości pCO_2 i WBC.

WBC	Wartość pCO_2		
	<35 mmHg	35-45 mmHg	>45 mmHg
4-10 tys./ μ l	0%	24%	25%
10-15 tys./ μ l	78%	32%	44%
>15 tys./ μ l	22%	44%	31%



Rycina 1. Wartości WBC w zależności od rodzaju porodu.

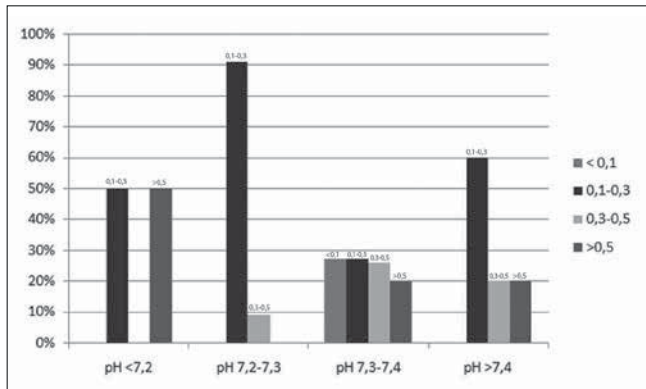


Rycina 2. Odsetek wyników otrzymanych w określonych przedziałach wartości pH i WBC.

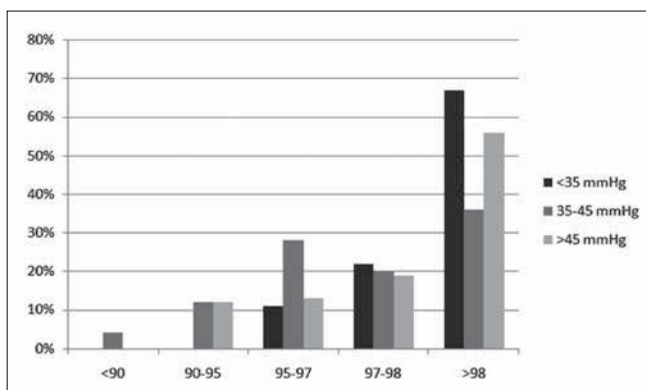
WBC czy pCO_2 . Istotną statystycznie okazała się jedynie zależność żywotności KM od poziomu pH, przy podziale na dwie grupy: $\geq 7,3$ i <7,3.

Grupę pacjentek rodzących siłami natury poddano analizie eksploracyjnej na podstawie, której zbudowano drzewo decyzyjne wskazujące wpływ wartości WBC i pH na ilość komórek CD34+. Wykazano, że: jeżeli WBC <12 tys./ μ l lub jeżeli WBC jest nie mniejsze niż 12, ale jednocześnie pH jest <7,3 to można przewidywać, że CD34+ będzie mieściło się w przedziale 0,2-0,3; zaś jeżeli WBC ≥ 12 tys./ μ l przy jednoczesnym pH $\geq 7,3$ to CD34+ będzie mieściło się w przedziale 0,1-0,2. Wyniki te przedstawia Rycina 5.

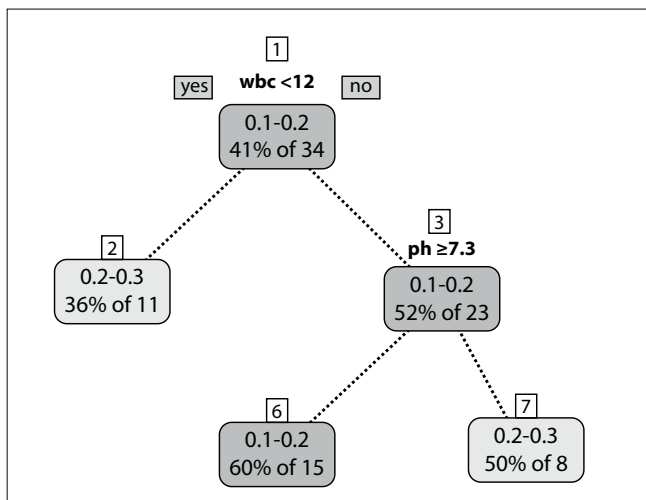
Rafał Stojko et al. Wpływ pH i pCO_2 krwi pępowinowej uzyskiwanej okoloporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych.



Rycina 3. Odsetek wyników otrzymanych w określonych przedziałach wartości pH i liczby komórek CD34+.

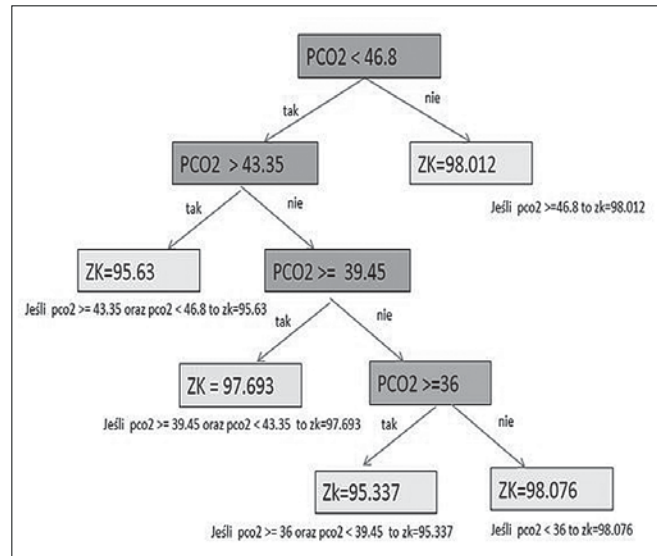


Rycina 4. Odsetek wyników otrzymanych w określonych przedziałach wartości pCO_2 i żywotności komórek macierzystych.

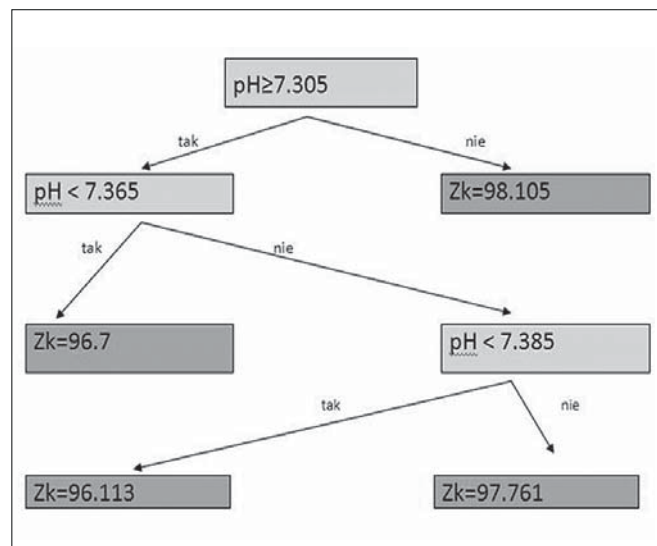


Rycina 5. Ilość CD34+ w grupie pacjentek rodzących siłami natury w zależności od wartości WBC oraz pH.

Następnie podjęto próbę zweryfikowania hipotezy, czy można na podstawie pCO_2 przewidywać żywotność KM. Wyniki przedstawia Rycina 6. Najwyższy poziom żywotności KM uzyskano przy $pCO_2 < 36$ mmHg i wynosiła ona 98,076. Równie wysoki poziom odnotowano przy $pCO_2 \geq 46,8$ mmHg, gdzie mieścił się on w granicach 98,012.



Rycina 6. Żywotność komórek w zależności od poziomu pCO_2 .



Rycina 7. Żywotność komórek w zależności od poziomu pH.

Najniższy poziom (95,337) odnotowano w przedziale pCO_2 między 36-39,45 mmHg. Przy pCO_2 43,35-46,8 mmHg żywotność KM była równa 95,63.

Analizowano również poziom żywotności KM w korelacji z pH próbki, co przedstawia Rycina 7. Stwierdzono, że przy pH 7,305-7,365 żywotność KM była równa 96,7, zaś jeśli pH < 7,305 to żywotność KM była równa 98,105. Natomiast jeśli pH zawierało się pomiędzy 7,365 a 7,385 to żywotność KM wynosiła 96,113, oraz gdy $pH \geq 7,385$ to żywotność KM – 97,761.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach własnych oceniano wpływ pH krwi pępowinowej na żywotność KM. Największy poziom żywotności KM (>98%) uzyskano przy pH < 7,3 oraz ≥ 7,4. Wykazano także, że żywotność KM spada do 97%-98% przy pH w granicy 7,3-7,4.

Rafał Stojko et al. Wpływ pH i pCO_2 krwi pępowinowej uzyskiwanej okołoporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych.

Badania przeprowadzone przez zespół Aufderhaara wykazały zależność między stężeniem hematopoetycznych KM a przebiegiem porodu udowadniając, że niskie pH krwi pępowinowej i długa pierwsza faza porodu mają wpływ na stężenie hematopoetycznych KM oraz ich żywotność mierzona liczbą kolonii komórkowych [14].

Shelbak potwierdził również, że niskie pH dodatnio koreluje z liczbą komórek jednojądrzastych (MNC) we krwi pępowinowej, a liczba kolonii CFU-GM jest proporcjonalna do długości pierwszej fazy porodu [15]. Richardson w swojej pracy wykazał niewielki spadek pH krwi pępowinowej w trakcie PSN [16].

Można na tej podstawie wnioskować, że odpowiedzią organizmu na stres związany głównie z niedotlenieniem, występującym w przebiegu PSN, jest zwiększenie ilości KM we krwi pępowinowej.

Wiele badań potwierdza większą odpowiedź stresową organizmu noworodka w trakcie PSN w porównaniu do CC. Sparrow i wsp. w swoich pracach dowiedli, iż we krwi pępowinowej po PSN występuje zwiększona liczba WBC i większa ilość komórek CD 34+ w porównaniu do CC [17].

Badając pobraną krew pępowinową, wykazano, że na podstawie samej wartości pH nie można dokładnie przewidzieć ilości komórek CD34+. W przypadku gdy pH jest na poziomie 7,35-7,40 zakres wartości CD34+ wynosił 0,3%-0,4%. Największą ilość CD34+ uzyskano dla pH w przedziale 7,30-7,35 (0,4%-0,5%). Badając wpływ pH na liczbę komórek jądrzastych – WBC, wykazano korelację odwrotnie proporcjonalną. Im wyższy poziom pH, tym niższa okazała się liczba WBC. Najniższą liczbę WBC (12,075 tys./ μ l) uzyskano dla pH 7,30-7,37, a najwyższa (16,816 tys./ μ l) występowała przy pH 7,29-7,32.

Molloy i wsp. wykazali odporność na apoptozę białych krwinek, podkreślając, że leukocyty z krwi pobranej po CC nie reagują na liposacharydy, co świadczy o ich obniżonej aktywności. Uzyskane rezultaty potwierdzają hipotezę, że skurcze porodowe generujące stres oksydacyjny mają bezpośredni wpływ na KM krwi pępowinowej [18].

W badaniach własnych porównano także rodzaj ukończenia ciąży z żywotnością KM, gdzie nie wykazano istotnej korelacji. Analizując wyniki pacjentek rodzących siłami natury zauważono, że przy $WBC < 12$ tys./ μ l CD34+ mieściło się w przedziale 0,2%-0,3%.

Można sugerować, że zwiększona liczba KM po porodach przebiegających z dłuższym narażeniem na stres oksydacyjny (długotrwała akcja skurczowa) może być wynikiem mobilizacji KM z puli komórek zapasowych [19, 20].

W dalszym etapie założono, że wartości pCO_2 mają także wpływ na właściwości transplantacyjne badanego materiału. Najwyższą żywotność uzyskano przy pCO_2 próbek < 36 mmHg oraz ≥ 46 mmHg, a najniższą wartość gdy pCO_2 mieściło się między 36-39,45 mmHg oraz między 43,35 a 46,8 mmHg i wynosiła ona nieco powyżej 95.

Z badań własnych wynika, iż najwyższą żywotność KM uzyskujemy gdy pH pobranej próbki KP jest $\geq 7,305$ i wynosi ona 98,105 oraz gdy $pCO_2 < 36$ mmHg i wynosi odpowiednio 98,076.

Badania porównujące metody ukończenia ciąży miały ocenić różnice w gazometrii krwi pępowinowej i reakcji układu białokrwinkowego jako wykładnika określającego dobrostan płodu. Pomorski i wsp. w swoich badaniach nie uzyskali istotnej różnicy pH krwi pobranej okołoporodowo i w trakcie CC [8, 9]. W bada-

niach wcześniejszych Mancinelli i wsp. wykazali zdecydowanie większą WBC we krwi pępowinowej po PSN [8, 21].

Wykonana analiza danych z wykorzystaniem drzew decyzyjnych miała na celu uwidocznienie „ukryte” zależności między grupami danych. W badaniach miały one wykazać czy możliwe jest przybliżone określenie jakości uzyskanego materiału na podstawie parametrów pH oraz pCO_2 w taki sposób aby uzyskać jak najlepszy jakościowo materiał a w konsekwencji najlepszego dawcę.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wnioski, że żywotność komórek macierzystych krwi pępowinowej wzrasta wraz ze spadkiem pH i pCO_2 . Sposób ukończenia ciąży nie wpływa istotnie na żywotność komórek macierzystych. Wzrost liczby komórek CD34+ koreluje dodatnio z podwyższoną leukocytozą.

Oświadczenie autorów

1. Rafał Stojko – autor założeń i koncepcji pracy.
2. Agnieszka Droszol-Cop – przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
3. Cecylia Jendyk – zebranie materiału, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa.
4. Marcin Sadłocha – współautor tekstu pracy i protokołu, korekta i aktualizacja literatury.
5. Agnieszka-Nowak-Brzezińska – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji.
6. Dariusz Borucki – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji.
7. Tomasz Ołdak – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji.

Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy

Piśmiennictwo

1. Opinia Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w sprawie pobierania i deponowania komórek macierzystych krwi pępowinowej. *Ginekol Pol.* 2010, 81, 874-876.
2. Parlament Europejski. Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dnia 11 września 2012 r. w sprawie dobrowolnego honorowego dawstwa tkanek i komórek. 2011/2193(INI).
3. <http://www.rynekzdrowia.pl/Badania-i-rozwoj/Bankowanie-krwi-pepowinowej-mozliwosc-wykorzystania-mocno-ograniczona,124436,11.html> [06.11.2013].
4. Jozwiak S, Habich A, Kotulska K, [et al.]. Intracerebroventricular Transplantation of Cord Blood-Derived Neural Progenitors in a Child With Severe Global Brain Ischemic Injury. *Cell Medicine (Part B of Cell Transplantation)*. 2010, 1, 71-80.
5. Machaj E, Ołdak T, Gajkowska A, Szczecina R. Pozyskiwanie, preparatyka i zamrażanie krwi pępowinowej dla celów klinicznych. *Acta Haematol.* 2001, 32, 110-113.

Rafał Stojko et al. Wpływ pH i pCO_2 krwi pępowinowej uzyskiwanej okoloporodowo na wybrane parametry komórek macierzystych.

6. Burgio GZ, Gluckman E, Locatelli F. Ethical reappraisal of 15 years of cord blood transplantation. *Lancet*. 2003, 361, 250-252.
7. Broxmeyer H. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. StemBook ed. The Stem Cells Research Community. *Harvard Stem Cell Institute*. Cambridge (MA) 2008.
8. Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, [et al.]. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant Proc*. 2006, 38, 1174-1176.
9. Richardson BS, Czikk M, DaSilva O, Nabale R. The impact of labor at term on measures of neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 192, 219-226.
10. Redzko S, Przepieszc J, Zak J, [et al.]. Influence of perinatal factors on hematological variables in umbilical cord blood. *J Perinat Med*. 2005, 33, 42-45.
11. Gessler P, Dahindeh C. Increased respiratory burst and increased expression of complement receptor - 3 (CD11b/CD18) and of IL-8 receptor-A in neutrophil granulocytes from newborn after vaginal delivery. *Biol Neonate*. 2003, 83, 107-112.
12. Stanisław A. Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. TOM I, II, III. Kraków: *Wydawnictwo StatSoft*. 2006.
13. <http://cran.r-project.org/http://rattle.togaware.com/> [04.11.2013].
14. Aufderhaar U, Holzgreve W, Danzer E, [et al.]. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. *J Perinat Med*. 2003, 31, 317-322.
15. Shlebak AA, Roberts IA, Stevens TA, [et al.]. The impact of antenatal and perinatal variables on cord blood haematopoietic stem/progenitor cell yield available for transplantation. *Br J Haematol*. 1998, 103, 1167-1171.
16. Richardson BS, Czikk MJ, DaSilva O, Natalae R. The impact of labor at term on measures of neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 192, 219-226.
17. Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT, [et al.]. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion*. 2002, 42, 210-215.
18. Molloy EJ, O'Neill AJ, Doyle BT, [et al.]. Effects of heat shock and hypoxia on neonatal neutrophil lipopolysaccharide responses: altered apoptosis, Toll-like receptor-4 and CD11b expression compared with adults. *Biol Neonate*. 2006, 90, 34-39.
19. Suchocki S, Słobodzin J, Kolomyjec P, Szymczyk A. Correlation between pH, pCO_2 values of umbilical blood collected from the umbilical vein after labor at cesarean section and clinical neonatal assessment. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*. 2008, 1, 2, 108-110.
20. Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med*. 2001, 344, 467-471.
21. Pence S, Kocoglu H, Balat A. The effect of delivery on umbilical arterial cord blood gases and lipid peroxides: comparison of vaginal delivery and cesarean section. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2002, 29, 212-214.

K O M U N I K A T



V SYMPOZJUM

Postępy w położnictwie i ginekologii

17-18 października 2014

Hotel DoubleTree by Hilton • Łódź

Symposium przygotowane zostało pod patronatem Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego oraz we współpracy z Europejskim Towarzystwem Położniczo-Ginekologicznym EBCOG.

Jego celem jest zapoczątkowanie jak najszerzej współpracy polskiego środowiska położniczo-ginekologicznego ze strukturami europejskimi.

Będzie platformą wymiany doświadczeń dla całego środowiska położniczo-ginekologicznego, a także miejscem prezentacji oryginalnych doniesień własnych oraz dyskusji z ekspertami i specjalistami – z kraju i Europy.

W programie Sympozjum seminarium z redaktorami zagranicznych czasopism anglojęzycznych dotyczące projektowania i prowadzenia badań, metodyki, statystyki, redagowania, edytowania oraz publikowania wyników.

Zaproszenie do wygłoszenia wykładów przyjęli najwybitniejsi polscy i zagraniczni specjaliści w wybranych dziedzinach medycyny.

ZAPROSZENI GOŚCIE ZAGRANICZNI:

- **Tahir Mahmood** – Prezes Europejskiego Towarzystwa Położniczo-Ginekologicznego EBCOG
- **Juriy Władimiroff** – Przewodniczący ds. Akredytacji i Podspecjalności Europejskiego Towarzystwa Położniczo-Ginekologicznego EBCOG
- **Rolf Kirschner** – Sekretarz Generalny Europejskiego Towarzystwa Położniczo-Ginekologicznego EBCOG
- **Janesh Gupta** – Redaktor Naczelny European Journal of Obstetrics and Gynaecology
- **Jim Thornton** – były Redaktor Naczelny European Journal of Obstetrics and Gynaecology oraz British Journal of Obstetrics and Gynaecology

TEMATY WIODĄCE SYMPOZJUM:

- Sesja EBCOG – Europejskiego Towarzystwa Położniczo-Ginekologicznego
- Sesja Endokrynologii i Niepłodności
- Sesja Perinatologiczna, Poród Przedwczesny
- Sesja Onkologii Ginekologicznej
- Sesja Diagnostyki Prenatalnej
- Sesja z redaktorami naczelnymi EJOG – European Journal of Obstetrics and Gynaecology
- Sesja Andrologiczna
- Sesja Terapii Płodności
- Sesja Ginekologiczna
- Sesja Urologii Ginekologicznej
- Sesja Ginekologii Operacyjnej
- Sesja Oryginalnych Doniesień Własnych
- Sesja Założycielska ENTOG Polska – Europejskiego Stowarzyszenia Specjalizujących się w Położnictwie i Ginekologii
- Sesja Położnych
- Sesja Doniesień Studenckich

Szczegółowe informacje znajdą Państwo na stronie:

www.grupamedica.pl

ZAPRASZAMY



Grupa Medica s.c. • ul. Pomorska 40, 91-408 Łódź,
tel. 42 630 01 88, faks 42 630 07 74 • biuro@grupamedica.pl