

Bankowanie krwi pępowinowej w Europie i na świecie w świetle doniesień prezentowanych na 23. Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Amsterdamie

Cord blood banking in Europe and worldwide
presented during the 23rd Regional Congress of the
International Society of Blood Transfusion in Amsterdam

Elżbieta Lachert, Agata Płodzich

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Podczas Regionalnego Kongresu ISBT, który odbył się w Amsterdamie w dniach 2–5 czerwca 2013 roku przedstawiono między innymi wiele prac dotyczących terapii komórkowych.

Temat ten prezentowany był podczas sesji plakatowej (*Cellular Therapies*) oraz w trakcie sesji plenarnych. W ramach sesji plakatowej przedstawiono 33 oryginalne prace dotyczące bankowania komórek macierzystych, w tym krwi pępowinowej, jak również metod pobierania, preparatyki, przechowywania i wydawania komórek macierzystych oraz ich klinicznego stosowania.

Bankowanie komórek macierzystych krwi pępowinowej

Przeszczepianie hematopoetycznych komórek macierzystych jest jedną z metod leczenia niektórych chorób układu krwiotwórczego. Przez wiele lat jedynym źródłem takich komórek był szpik. W światowych rejestrach dawców szpiku znajduje się obecnie ponad 18 milionów honorowych dawców, jednak dobrać dawców zgodnych w układzie HLA można tylko dla 34–70% pacjentów. Dla pacjentów, którym nie udało się dobrać zgodnego dawcy, alternatywą jest przeszczepianie autologicznych komórek macierzystych z krwi obwodowej lub komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Komórki macierzyste pozyskiwane zarówno ze szpiku, krwi obwodowej, jak i pępowiny, są komórkami pierwotnymi, niedojrzałymi i niewyspecjalizowa-

nymi, o wysokim potencjale proliferacyjnym oraz zdolności samoodnowy. Począwszy od 2008 roku, kiedy Gluckman i wsp. wykonali pierwsze przeszczepienie komórek macierzystych krwi pępowinowej od dawcy spokrewnionego (rodzeństwo), przeprowadzono tysiące przeszczepień od dawców zarówno rodzinnych, jak i niespokrewnionych. W porównaniu z komórkami szpiku czy krwi obwodowej komórki macierzyste krwi pępowinowej są mniej dojrzałe i mniej ukierunkowane, dlatego ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko biorcy (GvHD, *graft versus host disease*) jest mniejsze niż po przeszczepieniu allogenicznych komórek szpiku. Ponadto, sam zabieg pobierania krwi pępowinowej jest prosty, trwa krótko, a co najważniejsze, jest nieinwazyjny, nie stanowi zatem zagrożenia dla zdrowia matki i noworodka. W związku z powyższym zainteresowanie komórkami macierzystymi z krwi pępowinowej stale rośnie i skutkuje coraz większą liczbą specjalnych banków przeznaczonych do przechowywania krwi pępowinowej. Metody organizowania takich placówek i przechowywania krwi pępowinowej przedstawił w swoim wykładzie Thomas Bart. W chwili obecnej na świecie istnieje ponad 150 publicznych banków krwi pępowinowej, w których zgromadzono około 600 000 jednostek takiej krwi. Istnieje również ponad 200 prywatnych banków krwi pępowinowej (tzw. banków rodzinnych), w których przechowywane jest prawie 1 000 000 jednostek takiej krwi. Finansowanie publicznych projektów bankowania

krwi pępowinowej stanowi coraz większy problem wszędzie na świecie z wyjątkiem Kanady, gdzie na program taki przeznaczono aż 48 mln dolarów. W trakcie wykładu autor zwrócił uwagę na zasadniczą przyczynę różnic w zakresie finansowania; jest nią duża dysproporcja pomiędzy liczbą przechowywanych jednostek krwi pępowinowej (KP), a stosunkowo niskim zapotrzebowaniem na ich przeszczepianie. W efekcie rzeczywiste koszty bankowania krwi pępowinowej przerastają koszty szacunkowe. Najważniejszym czynnikiem dysproporcji w liczbie jednostek krwi pępowinowej jest to, że średnia liczba komórek jednojądrzastych (NC, *nucleated cells*) jednostek przeszczepionych krwi pępowinowej jest o wiele wyższa niż TNC przechowywanych jednostek krwi pępowinowej. Prowadzi to do zubożenia zasobów jednostek krwi pępowinowej na świecie i pozostawiania w bankach tylko jednostek o niskiej liczbie TNC. Jednym z możliwych rozwiązań problemu finansowego jest przyjmowanie do banku publicznego tylko jednostek krwi pępowinowej o wysokiej liczbie TNC.

Kolejną propozycją finansowego zabezpieczenia interesów publicznych banków krwi pępowinowej jest równoległe prowadzenie komercyjnego, prywatnego systemu, bankowania wykorzystującego tę samą infrastrukturę lub ewentualnie zastosowanie zasady partnerstwa opartego na wspólnej logistyce (rozwiązanie hybrydowe). Rozważa się także zmiany w zakresie strategii kwalifikacji dawców, szczególnie dotyczy to dawców z rzadkim fenotypem HLA, którzy stanowią zabezpieczenie dla małych populacji, w niewystarczającym stopniu uwzględnianych dotychczas w rejestrach komórek macierzystych. Należy jednak pamiętać, że zmiany w zakresie kryteriów kwalifikacji nie powinny przebiegać kosztem liczby TNC. Jednostki krwi pępowinowej, nawet o niskiej zawartości TNC również należy przechowywać w banku ze względu na rzadki fenotyp. U pacjentów z rzadkim fenotypem HLA niełatwo jest uzyskać zgodność tkankową, dlatego pula jednostek krwi pępowinowej powinna być możliwie duża [1].

Publiczne banki krwi pępowinowej

W publicznych bankach krwi pępowinowej (PBKP) przechowywane są allogeniczną krew pępowinową przekazywaną z pobudek altruistycznych i przeznaczoną do wykorzystania przez ośrodki transplantacyjne po uprzednim wyszukaniu w rejestrach. W niektórych PBKP istnieją systemy przechowywania krwi pępowinowej dla „rodzeń-

stwa” lub członków rodzin, w których stwierdzono predyspozycje do określonych chorób genetycznych. Wielkość takiego rejestru zależy przede wszystkim od przyjętych kryteriów kwalifikacji. Zgodnie z wyliczeniem *US Board on Health Sciences* z 2005 roku, aby zapewnić 90% prawdopodobieństwo dobrania jednostek (4/6 HLA) z minimalną liczbą komórek $2,5 \times 10^7$ TNC na kg masy ciała w amerykańskiej populacji liczącej 300 mln obywateli potrzeba co najmniej 100 tysięcy jednostek krwi pępowinowej. Zwiększenie minimalnej liczby komórek do 3×10^7 TNC/kg zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania zgodności w 200 tysiącach jednostek krwi pępowinowej. W swym raporcie Gluckman i Roch stwierdzili, że optymalna liczba jednostek krwi pępowinowej przechowywanych w banku powinna wynosić 9 jednostek na 100 000 mieszkańców. Z raportu przygotowanego w roku 2006 wynika, że rozpiętość w tym zakresie jest znaczna — począwszy od 0,01 dla Argentyny i Polski do 5,8 dla Australii. Warto podkreślić, że stosowanie coraz bardziej rygorystycznych kryteriów kwalifikacji powoduje, że w publicznych bankach krwi pępowinowej znajduje się znaczna liczba „niewykorzystanych”, „starych” jednostek, a ich przechowywanie jest przecież kosztowne.

Pobieranie i transport

Publiczny bank krwi pępowinowej nawiązuje współpracę z siecią szpitali w swoim regionie. W szpitalach tych krew pępowinowa pobierana jest *ex utero* lub *in utero* przez specjalnie przeszkolony w tym zakresie personel medyczny lub oddelegowany w tym celu personel banku. Procedura pobierania krwi pępowinowej ma istotne znaczenie, przede wszystkim dlatego, że na tym właśnie etapie występuje znaczne potencjalne ryzyko zakażenia, ponadto sam proces pobierania decyduje o jakości i ilości pobranych komórek. W zależności od banku i liczebności populacji od 30 do 70% pobranych jednostek krwi pępowinowej podlega dyskwalifikacji i przekazaniu wyłącznie do celów naukowych. Pole dla innowacji w zakresie wykorzystania takich jednostek i zwolnienia miejsca w bankach dla nowo pobranych jednostek jest bardzo szerokie.

Pobrane jednostki krwi pępowinowej umieszcza się w specjalnych pojemnikach służących do transportu w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$, wyposażonych w rejestratory temperatury. W takich warunkach są one przewożone do banku krwi pępowinowej, zgodnie z obowiązującymi procedurami bezpieczeństwa.

Kryteria kwalifikacji

W poszczególnych bankach obowiązują różne, niekiedy wieloetapowe procedury kwalifikacji jednostek krwi pępowinowej przeznaczonych do zamrożenia. Najczęściej zasadniczym kryterium kwalifikacji jest minimalna objętość preparatu, a następnie liczba komórek TNC, która — chociaż nie jest najlepszym wskaźnikiem jakości preparatu — stanowi parametr stosunkowo łatwy do oznaczenia i przydatny do wykonywania porównań. Zgodnie z wytycznymi np. *Netcord* czy *National Marrow Donor Program* (NMDP) podstawowym kryterium oceny preparatu jest liczba TNC.

W większości banków krwi pępowinowej wykonuje się następnie pomiar CD 34+. Ekspresja antygenu CD 34+, który jest markerem hematopoetycznych komórek progenitorowych, to kolejny, doskonalszy wskaźnik jakości preparatu oraz punkt odniesienia do liczby CD34+ po preparatyce.

Preparatyka

W procesie preparatyki objętość krwi pępowinowej poddawana jest redukcji dla obniżenia kosztów przechowywania, zmniejszenia ilości niezbędnego krioprotektantu, jak również w celu obniżenia ryzyka hemolizy związanego z mniejszą liczbą krwinek czerwonych.

Standardowa procedura redukcowania objętości krwi pępowinowej metodą manualną została opracowana przez Dr Pablo Rubinsteina, w pierwszym banku krwi pępowinowej na świecie. Dzięki tej metodzie można uzyskać około 20 ml kożuszka leukocytarno-płytkowego. Rubinstein opracował także metodę redukcowania objętości metodą sedymentacji z zastosowaniem hydroksyetylowanej skrobi (HES). Od lat rutynowo stosowana jest także metoda preparatyki krwi pępowinowej metodą wirowania, a składniki krwi pępowinowej (krwinki czerwone, kożuszek i osocze) rozdzielane są manualnie za pomocą prasy, z dokładnością, która zależała od wizualnej oceny osoby odpowiedzialnej za procedurę. W 2001 roku wprowadzono Sepax[®], w pełni zautomatyzowany zamknięty system do preparatyki krwi pępowinowej stosowany obecnie na całym świecie oraz systemy półautomatyczne takie jak AXP[™], AutoXpress[™], (Thermogenesis[®]), Optipress[™] (Fenwal[™]), Compomat[®] (Fresenius Kabi). Automatyzacja w znacznej mierze przyczyniła się do poprawy jakości krwi pępowinowej poddanej preparatyce i pozwoliła zminimalizować czynniki ryzyka związane z zastosowaniem systemu otwartego. Zgodnie z wytycznymi *the Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy* (FACT) oraz

Amerykańskiego Stowarzyszenia Banków Krwi (AABB, *American Association of Blood Banks*) kożuszek leukocytarno-płytkowy pobierany jest zawsze do pojedynczych lub podwójnych pojemników z tworzywa sztucznego. W przypadku pojemników podwójnych, jeden z nich obejmuje 20% objętości całkowitej, w której następuje namnażanie przed przeszczepieniem. W wielu banków stosuje się wyłącznie pojemniki pojedyncze, aby ograniczyć ryzyko związane z możliwością odpawiania części preparatu.

Przechowywanie

Preparat o zmniejszonej objętości (około 20 ml) poddawano krioprezerwacji za pomocą 5 ml roztworu (55% DMSO, 5% dekstran, woda) do uzyskania końcowej objętości 25 ml i docelowego 10% stężenia DMSO, które powinno być dodane w ciągu 12 minut. Badania mikrobiologiczne wykonuje się przed i po przetworzeniu. Przed poddaniem krioprezerwacji każda jednostka musi być badana. Pojemniki z preparatem umieszcza się w osłonie zabezpieczającej, a następnie w metalowych okładkach. Osłona chroni pojemnik, a w razie wycieku uniemożliwia zabrudzenie innych pojemników znajdujących się w kriostatach z azotem. Ma to szczególne znaczenie w przypadku pojemników przechowywanych w ciekłym azocie. Ze względu na to, że gwałtowne zanurzenie w ciekłym azocie stanowi szok dla komórek, jednostki krwi pępowinowej umieszcza się najpierw w aparacie do kontrolowanego mrożenia (aparat taki należy uprzednio poddać procedurze walidacji). Preparaty krwi pępowinowej można przechowywać w ciekłym azocie lub w parach azotu. Większość banków stosuje metodę przechowywania w parach azotu.

Prywatne (rodzinne) banki krwi pępowinowej

Prywatne banki przechowują krew pępowinową przeznaczoną dla rodziny lub do stosowania autologicznego. Banki publiczne pobierają krew pępowinową z około 1% porodów, natomiast w przypadku rodzinnych banków odsetek ten wynosi ponad 15%. W przypadku banków komercyjnych pobieranie krwi pępowinowej jest obciążone dodatkowym ryzykiem, ponieważ rodzice otrzymują specjalny zestaw do pobierania i umawiają się z położną, a miejsce porodu nie zawsze odbywa się w placówce nadzorowanej przez dany bank krwi pępowinowej. Pozostałe procedury dotyczące kryteriów kwalifikacji, preparatyki, krioprezerwacji i przechowywania są takie same jak w bankach publicznych [2, 3].

Podczas sesji plakatowej autorzy z Uniwersytetu w Kairze oraz Uniwersytetu w Beni Suef, przedstawili pracę, której tematem była ocena czynników, które mogą wpływać na objętość i zawartość komórek TNC (dotyczy to czynników zarówno po stronie matki, położnej, jak i noworodka). Wprawdzie na całym świecie prowadzi się badania nad czynnikami, które mają wpływ na jakość otrzymywanych preparatów krwi pępowinowej oraz pozwalają ustanowić kryteria pozwalające wybrać do zamrożenia preparaty krwi pępowinowej najwyższej jakości, w krajach Środkowego Wschodu doświadczenie w tym zakresie jest stosunkowo niewielkie. Badaniom poddano 308 jednostek krwi pępowinowej. Na podstawie analizy danych ustalono, że waga urodzeniowa jest jednym z najważniejszych parametrów. Stwierdzono korelację pomiędzy wagą urodzeniową, a objętością preparatu, ilością TNCs, MNCs oraz CD 34+ /jednostkę ($p = 0,001$), jak również korelację pomiędzy tygodniem ciąży a TNCs, MNCs/ml, przy czym analiza kowariancji wielu zmiennych wykazała, że w każdym kolejnym tygodniu ciąży liczba komórek CD 34+ spada do 17,6%. Na wyniki te nie wpływają czynniki takie jak: wiek matki, cukrzyca, występowanie stanu przedrzucawkowego, rodzaj porodu oraz inne czynniki okołoporodowe. Możliwość przewidywania objętości preparatu oraz liczby komórek na podstawie informacji o matce i noworodku jeszcze przed przystąpieniem do preparatyki pozwoliłaby zredukować koszty związane z pobieraniem i preparatyką. Można założyć, że wysoka jakość preparatu krwi pępowinowej zależy od wagi noworodka (min. 3 kg) oraz terminu porodu (37.–40. tydzień) [4].

W czasie sesji plakatowej Bank Krwi Pępowinowej w Mediolanie przedstawił projekt wytwarzania żelu płytkowego z jednostek krwi pępowinowej, które nie zostały zakwalifikowane do przeszczepienia niespokrewnionym biorcom. Coraz bardziej restrykcyjne kryteria kwalifikacji do przeszczepienia jednostek krwi pępowinowej powodują, że liczba odrzuconych jednostek rośnie i warto pomyśleć o ich zagospodarowaniu. W tym celu opracowano metodę otrzymywania żelu płytkowego z 2–3 jednostek krwi pępowinowej. W założeniu mediolańskiego projektu Bank Krwi Pępowinowej byłby koordynatorem ogólnokrajowego programu stosowania żeli płytkowych w klinicznym leczeniu trudno gojących ran. Niełatwo jest zgromadzić odpowiednią liczbę jednostek niezakwalifikowanych do przeszczepienia, które jednocześnie byłyby zgodne w układzie ABO, a byłyby przechowywane nie dłużej niż 48 godzin od pobrania. Dlatego autorzy postanowili opracować

procedurę otrzymywania żelu płytkowego z pojedynczej jednostki krwi pępowinowej, a następnie zlewać otrzymany żel bezpośrednio przed jego aktywacją. Do badań przeznaczono tylko jednostki z zawartością komórek jednojądrzastych $< 1 \times 10^9$ i zawartością krwinek płytkowych $> 200 \times 10^6$ /ml. Zgodnie z obowiązującą procedurą krew pępowinową pobierano do pojemnika zawierającego 22 ml CPDA (JMS). Po uzupełnieniu roztworem soli do objętości 150 ml krew przenoszono do pojemnika transferowego i poddawano trzyetapowej procedurze preparatyki. Pierwszy etap obejmował tzw. miękkie wirowanie (180 g, 10 min) w celu uzyskania osocza bogatopłytkowego. Opcjonalnie stosowano drugie miękkie wirowanie (100 g, 10 min) w celu usunięcia jak największej liczby leukocytów. Trzeci etap polegał na przeniesieniu osocza bogatopłytkowego do 50 ml probówek (Falcon) i wirowaniu (1000 g, 10 min) w celu otrzymania osadu krwinek płytkowych. Osad płytek następnie rozcieńczano w osoczu ubogokomórkowym do osiągnięcia końcowego stężenia 2×10^9 /ml i zamrażano w temp. -80°C w mini pojemnikach z tworzywa sztucznego (PRPS[®] 1C i COL[®] C4, Biomed Dev) umożliwiających kliniczne zastosowanie preparatu. Po rozmrożeniu jednostki zlewano zgodnie z układem ABO, następnie dodawano batroksobinę (Plateltex-Act[®]) zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskano 12 jednostek krwi pępowinowej o średniej zawartości krwinek płytkowych $-235 \pm 45,5 \times 10^6$ /ml, które następnie poddano procedurze preparatyki i uzyskano koncentraty krwinek płytkowych odzyskujące średnio $25 \pm 5,8\%$ krwinek płytkowych. Zanieczyszczenia leukocytarne w poszczególnych preparatach nie przekraczały 1×10^6 , a badania mikrobiologiczne wszystkich próbek po zakończeniu procesu preparatyki były ujemne. Batroksobina dodana do puli koncentratu krwinek płytkowych pozwoliła uzyskać efekt żelowania i wykazać, że preparat spełnia swoje funkcje. Niestety, w tym przypadku nie można stosować preparatyki w układzie zamkniętym, która stanowi „złoty standard” przy otrzymywaniu żelu płytkowego, ponieważ po ostatnim wirowaniu krwi pępowinowej pozostaje jedynie niewielka objętość osadu płytek. Autorzy jednak twierdzą, że banki krwi pępowinowej, które dysponują pomieszczeniami o odpowiedniej klasie czystości, są w stanie zagwarantować sterylne warunki preparatyki w układzie otwartym. Procedura opracowana przez ośrodki we Włoszech umożliwia zagospodarowanie jednostek krwi pępowinowej niezakwalifikowanych do przeszczepienia oraz zastosowanie ich do innych celów klinicznych. Nie mniej ważne jest również poczucie satysfakcji

Tabela 1. Wyniki — jakość jednostek krwi pępowinowej przeznaczonych do przeszczepienia**Table 1.** Results — quality of cord blood units for transplantation

	TNC ($\times 10^9$)	CD 34+ ($\times 10^6$)	Total CFU ($\times 10^6$)	CFU-GM ($\times 10^5$)
Średnia \pm SD	1,30 \pm 0,36	4,33 \pm 2,49	2,05 \pm 1,09	9,80 \pm 5,54
Maksimum	3,69	20,54	12,94	75,92
Mediana	1,26	3,90	1,88	9,03
Minimum	0,40	0,31	0,22	0,40

TNC (*total nucleated cells*) — całkowita liczba komórek jednojądrzastych; total CFU (*total colony forming units*) — całkowita liczba jednostek tworzących kolonie; CFU-GM (*colony forming unit-granulocyte macrophage*) — jednostka tworząca kolonie granulocytów i makrofagów; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe

wynikające ze świadomości, że pobierana krew pępowinowa znajduje inne, ważne zastosowanie w praktyce klinicznej [5].

Przedstawiciel Japońskiego Czerwonego Krzyża wystąpił z pracą dotyczącą oceny aktualnie stosowanych kryteriów kwalifikacji jednostek krwi pępowinowej do przeszczepienia z uwzględnieniem liczby komórek po okresie przechowywania (odzyskanie). W okresie od 1995 r. do końca 2012 r. bank krwi pępowinowej wysłał do przeszczepienia 1417 jednostek krwi pępowinowej. Badania końcowe obejmowały: liczbę komórek jednojądrzastych (TNC), żywotność, CD34 + oraz CFU. Kryteria kwalifikujące krew pępowinową do przeszczepienia: 80% odzyskanie komórek jednojądrzastych (TNC), 70% żywotnych komórek, 60% odzyskanych komórek CD34+ w stosunku do wartości sprzed zamrożenia. Jeśli parametry nie spełniają powyższych kryteriów kwalifikacji lekarz odpowiedzialny za procedurę przeszczepienia w ośrodku transplantacyjnym decyduje o powtórzeniu badań lub wyborze innej jednostki krwi pępowinowej [6].

Informacje przekazane przez autorów przedstawionych wyżej prac z pewnością przyczynią się do poprawy jakości przechowywanych preparatów krwi pępowinowej jak również wskażą alternatywne metody wykorzystania preparatów krwi pępowinowej, które nie spełniają kryteriów kwalifikacji do przeszczepienia.

Piśmiennictwo:

1. Bart T. Cord blood banking in Europe and worldwide: factors of organization and sustainability. *ISBT Science Series* 2013; 8: 109–110.
2. Hamblin T. Stem cell banking — the growth of public and private cord blood banks. W: *World Stem Cells Report 2009*; 168–171. World Stem Cell Summit, Detroit, MI, October 4–6, 2010.
3. Bart T., Boo M., Balabanova S. i wsp. Impact of selection of cord blood units from the united States and Swiss registries on the cost of banking operations. *Transfus. Med. Hemother.* 2013; 40: 14–20.
4. Doudar N., Amin S., Abdel Shafy S., Issa H. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CF 34+ cell field for cord blood banking. *Vox Sang.* 2013; 105: 288.
5. Bergamaschi P., Sbarsi I., Marchesi A. i wsp. A new blood component: platelet gel from cord blood. National project. Validation of the protocol of production from single units. *Vox Sang.* 2013; 105: 287.
6. Takanashi M.T. Quality of Cord Blood Units shipped for Transplantation. *Vox Sang.* 2013; 105: 288.