

# BANKE POPKOVNIČNE KRVI – MEDICINA IN POSEL

*Primož Rožman, Metka Krašna, Marko Cukjati*

**Povzetek.** V popkovnični krvi (PK) so krvotvorne matične celice (KMC), ki so uporabne za terapijo. Poleg KMC vsebuje PK še vrsto drugih matičnih celic, ki postajajo zanimive za uporabo v regenerativni medicini. Javne neprofitne banke popkovnične krvi shranjujejo leta 2014 že več kot 609.000 enot popkovnične krvi, namenjenih solidarni mednarodni izmenjavi prek svetovnih registrov. Poleg tega je verjetno še enkrat več enot PK shranjenih v komercialnih zasebnih bankah, ki jo shranjujejo za avtologno uporabo. Aktivnost registrov PK je komplementarna delovanju registrov odraslih darovalcev krvotvornih matičnih celic, ki shranjujejo podatke o več kot 23 milijonih darovalcev. Ključni podatki za mednarodno izmenjavo enot PK so podatki o tipizaciji HLA ter podatki o številu KMC v shranjeni enoti PK. V komercialnih bankah tipizacija ni potrebna, ker je PK namenjena avtologni uporabi. Večina strokovnih združenj do pred kratkim ni podpirala shranjevanja avtologne PK v zasebnih bankah, ker za trenutne terapije avtologna PK ni široko uporabna. To mnenje pa se z razvojem tehnik in regenerativne medicine spreminja, zato se obetajo spremembe strokovnih stališč tudi na področju klinične uporabe avtologne PK. V Sloveniji deluje javna banka popkovnične krvi v okviru Zavoda RS za transfuzijsko medicino, poleg tega pa deluje tudi več ponudnikov zasebnega shranjevanja.

## BANKE POPKOVNIČNE KRVI IN GLAVNI MOTIVI ZA NJIHOVO USTANAVLJANJE

### Matične celice v popkovnični krvi

Krvotvorne matične celice (KMC) odraslega lahko izoliramo iz kostnega mozga ali periferne krvi. Poleg tega pa se matične celice (MC) nahajajo tudi v popkovnični krvi (PK), to je krvi ploda oziroma novorojenčka, ki je v posteljici in popkovnici. Te celice se lahko kasneje uporabijo za avtologno ali alogensko zdravljenje s transplantacijo (1, 2). Čeprav so o poskusu presaditve PK poročali že leta 1972, je prvo uspešno presaditev PK opravila šele Gluckmanova s sodelavci v Parizu leta 1988, ki je otroku s Fanconijevo anemijo presadila KMC njegove HLA identične sestre, in ta bolnik je še vedno živ in zdrav (3). Zdravljenje s presaditvijo alogenskih KMC iz PK je danes postalo alternativa bolj uveljavljeni presaditvi KMC iz kostnega mozga ali iz periferne krvi tudi za odrasle bolnike (4–6).

### Prednosti in pomanjkljivosti popkovnične krvi v primerjavi z drugimi viri matičnih celic

PK ima v primerjavi s kostnim mozgom ali periferno krvjo več prednosti; predvsem je preprosto zbiranje, ki ne pomeni tveganja za mater ali novorojenca. Poleg tega je tveganje za prenos bolezni pri presaditvi celic iz PK majhno, enote PK, ki so zamrznjene, pa so na razpolago takoj, ko je potrebna presaditev KMC. Matične celice iz PK imajo za razliko od MC odrasle osebe

precej boljši delitveni potencial, manjše število mutacij in daljše telomere, kar jim daje kakovostno prednost. Ker je glavni biološki faktor za uspeh alogenske presaditve tkivna skladnost, šele določitev skladnosti dajalca in prejemnika na podlagi tipizacije HLA z visoko ločljivostjo omogoči dobre klinične rezultate. Najpomembnejši antigeni so produkti šestih klasičnih polimorfnih lokusov HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 in -DPB1, ki jih ima vsak človek dvanajst. V primeru presajanja KMC priporočajo ujemanje vsaj v šestih od osmih alelnih lokusov (A, B, C, DRB1), medtem ko je pri PK dovolj že ujemanje v vsaj štirih od šestih alelov (A, B, DRB1).

KMC iz PK pa imajo tudi pomembno slabost – povprečna enota PK ima volumen okrog 100 mL in vsebuje v povprečju skoraj desetkrat manj KMC kot enota KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi odraslega darovalca. Posledica tega je kasnejše vgnezdenje po presaditvi, počasnejša regeneracija oz. daljši čas aplazije, pogostejši so tudi odpovedi presadka in zapleti v obdobju aplazije. Zaradi tega so KMC iz PK na začetku presajali samo otrokom.

Za zvečanje uspeha presaditve KMC so razvili več strategij. Uspeh presaditev PK pri odraslih se je res bistveno zvečal (7). Te strategije so namenjene po eni strani zvečanju števila KMC v presadku, po drugi strani pa spodbujanju prijetja presadka (Tabela 1). Prvo dosežemo bodisi z boljšimi načini zbiranja PK, hkratno presaditvijo dveh ali več enot PK (8, 9), skupno presaditvijo s PK haploidničnega darovalca ali z drugimi pomožnimi celicami (10, 11) in z namnoženjem celic *in vitro* (t. i. ekspanzija *ex-vivo*) (12). Drugo pa lahko dosežemo z zmanjšano intenzivnostjo kondicioniranja s kemoterapijo (13), z izboljšanjem vgnezdenja presajenih celic v kostni mozeg (*homing*), ali pa s presaditvijo neposredno v kostni mozeg bolnika (8, 14).

## **Javne banke popkovnične krvi in svetovni registri**

PK po odvzemu v porodnišnici shranjujejo v bankah PK. Banka PK je ustanova za celice in tkiva, ki zbira, obdeluje, shranjuje, dodeljuje in razdeljuje PK, namenjeno zdravljenju bolni s presajanjem (7). Shranjena PK se lahko uporabi kot vir KMC za sorodno (usmerjeno) ali nesorodno alogensko presaditev, manj pogosto tudi za avtologno presaditev. PK za alogenske namene shranjujejo v javnih bankah, za avtologne namene pa v zasebnih bankah PK. Zanimivo je, da je bila prva ustanovljena banka PK pravzaprav zasebna banka PK *Cryo-Cell International*, ki so jo ustanovili v ZDA že leta 1992 (15). Da bi dostopnost do nesorodne alogenske PK omogočili vsem bolnikom na solidarnostni način, so že leta 1993 v transfuzijski ustanovi *New York Blood Center* ustanovili prvo javno banko za shranjevanje PK (16). Na podlagi javnih programov shranjevanja PK, ki so jih kasneje začele še banke PK v Milanu, Düsseldorfu, Barceloni, Parizu, Londonu, Saint

Louisu, Leidenu, Denverju in Tokiu število enot shranjene krvi v bankah PK hitro narašča. Omrežje registrov shranjenih enot PK je sedaj razprostranjeno na vseh kontinentih in omogoča hiter dostop do primerne presadke (17). Shranjevanje PK poteka vzporedno z vzdrževanjem nacionalnih registrov odraslih tipiziranih darovalcev KMC. Ti nacionalni registri vodijo zbirke podatkov o prostovoljnih HLA-tipiziranih darovalcih, ki jih po potrebi pokličejo, če se za njihove celice pokaže potreba v članicah svetovnega registra *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW). Pri nas je tak nacionalni register *Slovenija Donor*, ki ima sedež na Zavodu RS za transfuzijsko medicino in je do 31. 8. 2014 vpisal 16.266 prostovoljnih darovalcev KMC (18).

Tabela 1. Glavni problemi pri presaditvah popkovnične krvi in strategije za njihovo reševanje.

Problem	Strategija za reševanje
Zapozneno prijetje presadka	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hkratna presaditev več kot ene enote PK</li> <li>• pomnoževanje progenitorskih celic CD34+</li> <li>• nemieloablativno kondicioniranje pacienta</li> <li>• sočasna infuzija PK in haploidentičnih KMC iz periferne krvi</li> <li>• hkratna presaditev PK in MMC</li> <li>• znotrajkostna presaditev PK</li> </ul>
Okužbe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• agresivno zgodnje in predhodno zdravljenje</li> <li>• potencialna raba T-celic, specifičnih za patogene</li> </ul>
Ponovitev bolezni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• presaditev 2 enot PK pri bolnikih z akutno levkemijo</li> <li>• adoptivna imunoterapija: <ul style="list-style-type: none"> <li>- uporaba T-celic iz PK, ki izražajo himerne antigenske receptorje za tarčne malignosti B-celic</li> <li>- uporaba celic NK iz PK, namnoženih <i>ex vivo</i></li> <li>- NK-celična imunoterapija kot del nove trojne presaditve PK</li> <li>- infuzija limfocitov haploidentičnih darovalcev (DLI – <i>donor lymphocyte infusion</i>) pri presaditvah PK s haploidentičnimi KMC</li> </ul> </li> </ul>

KMC – krvotvorne matične celice

MMC – mezenhimske matične celice

NK – naravne celice ubijalke

PK – popkovnična kri

Potreba po mednarodnem sodelovanju in izboljšavi vseh tehnik v zvezi z zbiranjem, obdelavo, testiranjem ter uporabo PK je leta 1998 vodila k ustanovitvi združenja *Netcord* (<http://www.netcord.org/>) v sodelovanju z organizacijama JACIE (*Joint Accreditation Committee ISCT&EBMT*, <http://www.celltherapysociety.org/>; <http://www.ebmt.org>) in FACT (*Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy*, <http://www.factwebsite.org/>), ki so oblikovali mednarodne standarde kakovosti za delovanje bank PK (19–21). Na področju PK so poleg omenjenih aktivna še druga združenja, npr. *Evrop-*

sko združenje registrov PK EUROCORD (<http://www.eurocord-ed.org>), World Marrow Donor Association (WMDA, <http://www.worldmarrow.org/>) in Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW, <http://www.bmdw.org/>).

Javne banke shranjujejo PK novorojencev za javno uporabo, kar je podobno altruističnemu sistemu transfuzije in temelji na etičnih načelih krvodajalstva, kot so prostovoljnost, neplačanost, anonimnost in solidarnost. Starši se v imenu otroka odrečejo PK in jo podarijo v skupni register. Enote PK nato HLA-tipizirajo in zamrznejo ter so na voljo vsem bolnikom v državah članicah registra BMDW. Javne banke ponavadi vodijo vladne zdravstvene ustanove, plačujejo pa jih sistemi javnega zdravstva ali dobrodelne fundacije. Po podatkih BMDW je leta 2014 v javnih bankah shranjeno že več kot 609.000 enot PK, kar pa je še vedno izredno malo in obsega le 2,6 % od skupno 23.250.000 tipiziranih darovalcev KMC, vpisanih v svetovni register BMDW ([http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics\\_stemcell](http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics_stemcell)).

V številnih državah se pojavlja vprašanje, kako velika naj bo "zaloga" alogenske PK v banki PK. V ZDA so se namenili do leta 2010 zbrati 150.000 enot PK, s čimer bi pokrili 90 % vseh potreb bolnikov (22); v Veliki Britaniji je načrt zbrati 20.000 enot, čeprav bi bila optimalno število verjetno 50.000. To število bi omogočilo, da bi bila verjetnost, da bi za vsakega bolnika našli vsaj enega 4/6 skladnega dajalca, okrog 98-odstotna (23). V Franciji nameravajo zbrati 30.000 enot PK do leta 2015 in 50.000 enot PK do leta 2020 (22). Velikost registra je seveda najbolj odvisna od lokalne etnične raznolikosti; v etnično močno raznolikem Singapurju tako pričakujejo, da je za 4,9-milijonsko državo potrebnih 10.000 enot PK, če želijo najti dajalca z 80-odstotno verjetnostjo (23, 24).

### **Zasebne banke popkovnične krvi**

Vzporedno z javnimi bankami PK so nastale tudi številne zasebne banke PK, v katerih shranjujejo novorojenčkovo PK za potencialno avtologno uporabo v njegovem življenju ali za njegove ožje sorodnike, zaradi česar jih imenujejo tudi "družinske banke" PK. Novi sorojenec ima namreč 25 % možnosti, da bo imel enako sestavo antigenov HLA kot starejši bratec ali sestra. Tak način imenujejo "usmerjeno" ali "družinsko" shranjevanje PK in ga nekatere ustanove podpirajo.

Posebna privlačnost shranjevanja PK za avtologno uporabo v primerjavi z alogensko je, da pri avtologni uporabi ne more priti do zavrnitve celic. Dejanska koristnost takega shranjevanja še ni znanstveno podkrepljena, saj je verjetnost, da bo otrok, čigar PK se shranjuje, v otroštvu zbolel za maligno boleznijo in potreboval presaditev lastnih KMC, izjemno majhna (manj kot 0,04 %), če vzamemo v obzir le tiste bolezni, ki jih zdravimo danes (7, 25, 26). Ob sedanjih načelih presajanja je verjetnost, da bomo zboleli in potrebovali

presadek lastnih KMC do starosti 20 let okrog 0,02 %, do starosti 40 let okrog 0,05 % in do starosti 70 let okrog 0,23 % (27). Avtologne celice so trenutno za zdravljenje nekaterih rakavih in prirojenih genskih boleznih neuporabne, ker lahko PK že sama vsebuje začetne mutacije DNA, značilne za rakave celice.

Zaradi majhnega števila kliničnih primerov in ker je od začetkov shranjevanja PK preteklo premalo časa, še ni objavljenih veliko statističnih rezultatov dosedanje uporabe PK za avtologne namene. Vendar kljub vsem mešanim strokovnim mnenjem velikost zbirk v zasebnih bankah presega tisto v javnih in še narašča.

Organizacija *Parent's Guide to Cord Blood Foundation* (<http://www.parentsguidecordblood.org/>) objavlja spisek, na katerem je 154 zasebnih in družinskih bank PK, ustanovljenih večinoma po letu 2000. Čeprav točni podatki niso dostopni, predvidevajo, da te banke shranjujejo že vsaj okrog dva do trikrat več enot PK kot javne banke (15). Kljub temu da so zasebne banke v zadnjih 20 letih zbrale več kot 1 milijon enot PK, ni objavljenih zanesljivih znanstvenih poročil o uporabi teh enot in izidih transplantacij (22). Dve zasebni banki, obe ustanovljeni leta 1995 – *Cordon Vital* (CBR) v Mehiki in *Cord Blood Registry* v ZDA – v neznanstvenih virih navajata, da sta izvedli do januarja 2009 vsaka okrog 90 presaditev avtologne PK, ali v povprečju 7,6 presaditev na leto obstoja (15). Nasprotno Sullivan navaja, da so bile do leta 2007 izvedene samo tri presaditve avtologne PK (7). Seveda pa se raziskave nadaljujejo in pričakovati je, da bo v bližnji prihodnosti na voljo več rezultatov kliničnih raziskav, ki trenutno potekajo (glej <http://clinicaltrials.gov/>).

### **Hibridne in mešane banke popkovnične krvi**

Tretja vrsta bank PK so t. i. hibridne banke, ki jih je več modelov. Večinoma so kombinirane javno-zasebne ustanove. V nekaterih hibridnih bankah shranjujejo PK za dajalca, vendar jo hkrati tudi HLA-tipizirajo, vpišejo v svetovni register in po potrebi namenijo tistemu bolniku, ki jo potrebuje. Nekateri zelo spodbujajo take banke PK, čeprav se soočajo s številnimi etičnimi in finančnimi problemi (15). Pričakujejo še drugo vrsto hibridnih bank – v njih bodo starši shranili del vsake enote PK za avtologne namene, drugi del pa bodo darovali v javno banko PK, kjer jo bodo HLA-tipizirali in vpisali v obstoječi svetovni register BMDW, kjer bo na voljo vsem bolnikom. Take banke so ustanovili že leta 2006 v Španiji, a zaenkrat še niso zaživele. Enako se dogaja v Veliki Britaniji s podobnim modelom privatne banke *Virgin Health Bank*, ki ji uspeva zbrati 10-krat manj enot, kot je predvidevala (22).

## **Etični zadržki pri shranjevanju popkovnične krvi za avtologne namene**

Poleg neenotnih strokovnih stališč glede utemeljenosti shranjevanja PK za avtologne namene zasebnim bankam očitajo nekritično komercializacijo in obljubo negotovih terapij v prihodnosti. Vendar avtolognega shranjevanja evropska zakonodaja ne prepoveduje, saj bi bilo to v nasprotju z načelom o svobodni izbiri posameznika. Izjeme so Francija, Luksemburg in Italija, kjer zasebne banke PK niso dovoljene. *Skupina za etiko v znanosti Evropske unije (The European Union Group on Ethics – EGE)* je leta 2005 izdala mnenje o etičnih vidikih shranjevanja PK, po katerem da za shranjevanje in uporabo avtologne PK trenutno ni dovolj indikacij; po drugi strani pa da bodo v prihodnosti za različne presaditve lahko uporabljali tudi alogensko PK ali matične celice odraslih dajalcev (28).

Državam članicam svetujejo strog nadzor nad temi bankami, kar potrjuje tudi direktiva 2004/23/ES *Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi standardov kakovosti in varnosti, darovanja, pridobivanja, testiranja, predelave, konzerviranja, shranjevanja in razdeljevanja človeških tkiv in celic*. *Skupina za etiko v znanosti Evropske unije* poziva, naj komercialne banke svoje stranke ustrezno informirajo in ne navajajo znanstveno nepreverjenih ali celo lažnih indikacij. Komercialne banke namreč zavajajo starše z navajanjem uporabnosti avtologne PK za indikacije, ki se v resnici nanašajo na alogensko zdravljenje s PK ali pa celo z drugimi tipi matičnih celic. Podobno stališče je leta 2008 zavzelo ameriško združenje *American Society for Blood and Marrow Transplantation* (29). Tudi stališče slovenske *Komisije za medicinsko etiko* iz leta 2008 je podobno.

Po drugi strani pa smo v zadnjih letih priča naglemu razvoju regenerativne medicine, ki obljublja uporabo avtolognih MC za zdravljenje degenerativnih bolezni, ishemičnih poškodb in tkivno inženirstvo. Privatne banke zato upravičeno argumentirajo, da je uničevati tako dragoceno tkivo kot so PK, posteljica in njene sestavine, neprimerno. Prav zaradi širokih možnosti uporabe matičnih celic v novih postopkih zdravljenja so v zadnjem času nekateri strokovni avtorji in združenja zasebnemu bančništvu bolj naklonjeni (30).

## **KLINIČNA UPORABA POPKOVNIČNE KRVI**

### **Presaditve alogenske popkovnične krvi za zdravljenje malignih bolezni**

Presaditve PK v večjem obsegu so začeli izvajati šele po letu 2000 in so se izkazale kot zelo uspešne. Od leta 1999 do 2009 je prejelo KMC iz PK že več kot 21.387 otrok in odraslih (31). Danes lahko za kar 95 % bolnikov, ki potrebujejo alogensko presaditev, najdemo skladno enoto PK v registrih

PK. Za razliko od tega najdemo HLA-skladnega darovalca KMC samo za nekaj več od polovice bolnikov, ki jo potrebujejo, čeprav je v svetovnih registrih darovalcev že več kot 23 milijonov darovalcev (32).

Uspešnost presaditev KMC iz PK je praviloma odvisna od celičnega odmerka in tkivne skladnosti. V primerih relativno velikega neskladja v antigenih HLA med PK in prejemniki so pri uporabi PK opazili presenetljivo malo primerov bolezni presadka zoper gostitelja (*Graft-versus-host disease*, GvHD;). Akutna GvHD je nastopila pri 11–39 %, kronična pa pri 9–31 % bolnikov po presaditvi PK, kar je precej manj kot pri presaditvi KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi. Smrtnost zaradi samega postopka presaditve je bila relativno visoka (okrog 50-odstotna), kar je bilo vsaj delno povezano z dejstvom, da je šlo za ogrožene bolnike z napredovalo boleznijo. Preživetje bolnikov, ki so prejeli skladen kostni mozeg, in bolnikov, ki so prejeli nesorodno in neskladno PK, je podobno. Primerjalne raziskave so jasno pokazale, da je presaditev nesorodne PK veljavna alternativa presaditvi KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi ne samo za pediatrične, ampak tudi za odrasle bolnike.

Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na prijetje presadka in posledično na preživetje bolnikov, je zato še vedno število oziroma odmerke presajenih matičnih celic (33). Skupina *EuroCord* priporoča, da je v shranjeni enoti PK število celic z jedrom (*nucleated cells*, NC) vsaj  $3 \times 10^7$ /kg telesne mase prejemnika, po odmrznjenju in pri presaditvi pa naj bi enota PK za presaditev vsebovala vsaj še  $2 \times 10^7$  NC/kg telesne mase (34). Skladnost v antigenih HLA med dajalcem in prejemnikom je dodatni dejavnik, ki vpliva na izid presaditev PK (35). Gluckmanova s sodelavci meni, da naj bi ujemanje v antigenih HLA razreda II (t.j. HLA-DR) dalo najboljše rezultate. Navaja tudi, da zvečanje celičnega odmerka vsaj ublaži negativni vpliv neskladnosti v HLA na uspeh presaditve (36).

### **Presaditve popkovnične krvi pri nemalighnih boleznih**

Nemalighne bolezni so najprej zdravili pri otrocih, ker so zanje dovolj majhni odmerki presajenih celic z jedrom iz PK, imajo manj primerov GvHD, učinek presadka zoper levkemijo pri teh boleznih ni potreben (GvL). V nasprotju z opisanim zdravljenjem malignih bolezni je pri nemalighnih boleznih ključnega pomena za prijetje presadka in preživetje visoka skladnost v antigenih HLA, ki prepreči nastanek GvHD, manj pomembno pa je število oz. odmerek presajenih celic. Zato priporočajo izbrati enote, ki so najbolj skladne, šele nato pa upoštevati tudi število celic, ki naj bi bilo vsaj vsaj  $3,5 \times 10^7$ /kg celic z jedrom (34).

### *Podedovane hemolitične anemije*

Učinkovitost presaditve KMC pri talasemiji še ni popolnoma raziskana, vendar se vedno bolj uveljavlja. Locatelli s sodelavci poroča o 44 otrokih s talasemijo in anemijo srpastih celic, pri katerih je bil delež prijetja presadka velik (89 % na 60. dan), preživetje brez ponovitve bolezni pa dobro (79 % za talasemijo in kar 90 % za anemijo srpastih celic) (37, 38). Menijo, da je presaditev alogenskih KMC iz PK sorojenca terapija prihodnosti za hemoglobi-nopatije, in razmišljajo o uvedbi obveznega zbiranja in hranjenja PK pri vseh porodih v družinah s primeri teh bolezni (39).

### *Sindromi odpovedi kostnega mozga*

Različne oblike odpovedi kostnega mozga, kot so mielodisplastični sindrom (MDS), aplastična in Fanconijeva anemija, že dolgo zdravijo s presaditvijo alogenskih KMC, vendar pri zdravljenju teh bolezni relativno pogosto prihaja do zavrnitve presadka. Ker sama presaditev PK zaradi majhnega odmerka KMC povzroči kasnejše prijetje presadka, je bilo celokupno preživetje teh bolnikov po presaditvi nesorodne PK v letih 1994–2005 majhno, še posebej pri MDS (okrog 35-odstotno) (34). Rezultati so pri sodobnejših načinih zdravljenja vse boljši. Zdravljenje Fanconijeve anemije s presaditvijo KMC iz PK je uspešnejše, saj je preživetje brez ponovitve bolezni relativno dobro, še posebej pri otrocih, ki prejmejo skladen presadek PK od sorodnika (40, 41).

## **Uporaba popkovnične krvi za regenerativne namene**

V PK so poleg krvotvornih tudi mezenhimske matične celice (MMC) in še nekatere druge matične celice. Diferenciacijski potencial in proliferativni odziv MMC iz placente je drugačen kot MMC iz kostnega mozga ali maščobnega tkiva (42). MMC iz placente očitno delujejo bolj zaviralno na imunski odziv, kar je verjetno posledica njihovega učinka na celice T (43, 44).

Matične celice iz PK so uporabili že za regeneracijo miokarda in živčnih tkiv in dobili spodbudne rezultate tako *in vitro* kot *in vivo* (45–48). Menijo, da bodo omogočile bistveno izboljšanje krčljivosti in prekrvitve srca pa tudi napredek v tkivnem inženirstvu srčnih zaklopk (49–51). Iz PK lahko osamimo tudi veliko funkcionalnih dendritskih celic, ki so uporabne za adoptivno celično zdravljenje (52), lahko pa jo predelamo tudi v trombocitni gel, ki vsebuje visoko koncentracijo ravnih dejavnikov, uporabnih v regenerativni medicini (53). Obetavne so tudi inducirane pluripotentne celice (*induced pluripotent stem cells*, iPSc) iz PK, ki se lahko uporabijo kot univerzalne celice v regenerativni medicini (8, 38). Pri tem je treba poudariti, da se tehnike uporabe MC iz PK za regenerativne namene večinoma šele razvijajo in zato pričakujejo njihovo širšo uporabo šele po letu 2020.



## **Ekspanzija krvotvornih matičnih celic iz popkovnične krvi *ex vivo***

Številne raziskave so pokazale, da je mogoče število KMC – zunaj telesa, v laboratorijskem okolju (*ex-vivo*) – pomnožiti 10 do 100-krat z dodajanjem različnih ravnih dejavnikov. Pri tem je značilno, da KMC iz PK bolje proliferirajo kot KMC iz kostnega mozga; verjetno zato ker so mlajše (8, 14). KMC lahko z gojenjem diferenciramo v različne vrste zrelih krvnih celic, na primer v megakariocite in trombocite (54), v granulocite in celo v naravne celice ubijalke (NK) in v celice LAK (*lymphokine-activated killer cytotoxic cells*), s katerimi si obetajo zdraviti rakave bolezni (55).

Raziskovalci v zadnjem času načrtujejo pridobivanje velikih količin eritrocitov, trombocitov in levkocitov *in vitro*, s čimer bi lahko nadomestili običajno transfuzijo in prostovoljno krvodajalstvo. Glavni cilj je pridobivanje velikih količin zrelih enukleiranih eritrocitov z odraslim hemoglobinom, ki imajo »univerzalno«, to je RhD-negativno krvno skupino 0. Tako proizvodnjo imenujejo *blood pharming*. Trenutno že imajo ustrezno metodo, vendar zaradi visokih cen ravnih dejavnikov še ne omogoča ustvarjanja velikih količin eritrocitov, primerljivih z učinkom krvodajalstva. Zanimivo je, da večina vseh protokolov kot začetno osnovo uporablja ravno matične celice iz PK (56). Doslej največja namnožitev eritroidne linije je uspela skupini Fujimija in kolegov leta 2008, ki je iz  $5 \times 10^6$  CD34-pozitivnih celic iz ene enote popkovnične krvi pridobila  $1,76 \times 10^{13}$  eritrocitov, kar ustreza 8,8 enotam koncentriranih eritrocitov (57).

## **ZBIRANJE, SHRANJEVANJE IN UPORABA MATIČNIH CELIC IZ POPKOVNIČNE KRV I V SLOVENIJI**

V Sloveniji so prvo zbiranje PK za sorodniško alogensko presaditev na pobudo Hematološko-onkološkega oddelka Pediatrične klinike leta 1999 izvedli strokovnjaki ljubljanske porodnišnice in Zavoda RS za transfuzijo, vendar do klinične presaditve kasneje ni prišlo. Leta 2008 je začela delovati javna banka PK (*Enota za shranjevanje popkovnične krvi*, ESPOK) na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani. V Sloveniji je bilo na dan 1. 5. 2014 v javni banki ESPOK shranjenih 1.034 enot PK. Načrt banke ESPOK je zbrati in vpisati v register največ 2.000 enot PK, kar bi pomenilo 10 shranjenih enot PK na 10.000 prebivalcev, kar je dovolj glede na relativno majhno etnično raznolikost slovenske populacije (Tabela 2). Darovanje oz. odvzem PK izvajajo v Sloveniji v porodnišnicah na podlagi dogovora z Zavodom RS za transfuzijsko medicino. V letu 2014 je darovalo PK povprečno 43 porodnic na mesec.

Tabela 2. Število shranjenih enot popkovnične krvi (PK) leta 2013 v nekaterih javnih bankah.

Država	Prebivalci leta 2013 (v milijonih)	Število shranjenih enot PK	Število enot PK na 10.000 prebivalcev
Singapur	4,9	11.050	22,55
Tajvan	23,37	49.118	21,02
Belgija	10,8	20.650	19,12
Španija	47,0	52.377	11,14
Izrael/	7,6	7.984	10,51
Avstralija	23,5	24.558	10,45
Finska	5,4	3.365	6,23
ZDA	310,0	177.758	5,73
Italija	60,3	28.822	4,78
J. Koreja	49,7	21.242	4,27
Švica	7,8	3.599	4,61
Češka	10,5	3.985	3,80
Nemčija	81,7	30.994	3,79
Velika Britanija	62,0	16.848	2,72
Francija	65,4	16.162	2,47
Nizozemska	16,6	3.098	1,87
Argentina	40,5	1.692	0,42
Poljska	38,1	820	0,22
Kitajska	1.365,0	38.966	0,29
Slovenija	2,0	1.034 (245 HLA tip)	5,17 (1,2)

PK odvzamemo v sterilno vrečko z antikoagulansom takoj po rojstvu otroka, ko je posteljica še *in utero*, s punkcijo popkovnične vene. Povprečni volumen odvzete PK skupaj z antikoagulansom je 68 ml. V javno banko shranimo samo tiste enote PK, ki imajo skupno število celic z jedrom (TNC) večje kot  $0,9 \times 10^9$  in volumen, večji od 61 mL. Zamrznemo jo ob dodatku 10 % krio-protectorja DMSO v roku največ 46 ur po odvzemu in shranimo v tekočem dušiku pri  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ko dobimo končne izsledke testiranja kakovosti PK (krvna slika, število CD34-pozitivnih matičnih celic, število eritrocitov z jedrom, živost celic, krvna skupina, število klonogenih krvotvornih celic CFU, tipizacija HLA-A, -B, -DRB1, potrditev, da ne vsebuje bakterij in gliv, ter virusni markerji materine krvi), sprostimo enoto PK iz karantene v trajno hranjenje.

Od vseh 4.370 doslej odvzetih enot PK smo jih v hranjenje uvrstili le okrog 23 % (1.034 enot), preostale pa smo zaradi nedoseganja prej omenjenih zahtev uničili. Po enem letu shranjevanja dopolnimo anamnezo o otrokovem zdravstvenem stanju in PK vpišemo med razpoložljive enote, primerne za izdajo. Antigene HLA smo doslej določili 245 enotam in jih tudi vpisali v mednarodni register. V treh letih, odkar je banka vpisana v register, nismo izdali še nobene enote. Odvzem PK v porodnišnicah in delovanje javne banke PK v Sloveniji še nista finančno urejena, saj dogovor o tem še ni bil sprejet na Ministrstvu za zdravje.

Poleg javne banke ESPOK na Zavodu RS za transfuzijsko medicino je v Sloveniji še nekaj ponudnikov zasebnega shranjevanja v komercialnih bankah PK. Vsi ponudniki so sicer registrirani kot *Ustanova za tkiva in celice* (<http://www.slovenija-transplant.si/index.php?id=ustanove>), vendar je le ena od njih dejanska slovenska banka PK, ki shranjuje celice v Sloveniji (*Biobanka d.o.o.*), medtem ko drugi dve (*Neocelica d.o.o.*, *Izborna celica d.o.o.*) pošiljata PK v tuje banke PK.

Delovanje bank PK nadzira *Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke* (JAZMP) v skladu z Zakonom o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC) (58).

## **Klinična uporaba popkovnične krvi v Sloveniji**

Prvo presaditev alogenske nesorodne PK smo v Sloveniji opravili šele leta 2004. PK je prišla iz avstralske banke popkovnične krvi v Sydneyu. Leta 2008 je bila opravljena druga nesorodna presaditev alogenske PK. V obeh primerih sta bila bolnika majhna otroka z maligno krvno boleznijo. Presajeni enoti PK sta bili HLA-skladni na vseh šestih testiranih lokusih (skladnost 6/6). V obeh primerih je presaditev potekala brez večjih zapletov, le čas do vgnezditev je bil daljši kot bi bil pri presaditvi alogenskih KMC nesorodnih dajalcev, kar je pričakovan pojav. Pojava GvHD ni bilo pri nobenem od obeh malih bolnikov, žal pa se je pri obeh kasneje ponovila osnovna krvna bolezen (59). Leta 2013 je bila opravljena prva nesorodna dvojna presaditev alogenskih enot PK pri pediatričnem bolniku s paroksizmalno nočno hemoglobinurijo z aplastično anemijo. Ker se celice niso vgnezdile, je bila kasneje izvedena še presaditev KMC nesorodnega darovalca.

## **ZAKLJUČEK**

Presaditev PK je danes uveljavljena terapija pri nekaterih boleznih otrok in odraslih. Izkušnje zadnjih 20 let kažejo, da je presaditev KMC iz PK postala ustrezna alternativa presaditvam KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi.

Ta presaditev je torej postala standardna terapija, ki se čedalje bolj širi. Priporočajo jo tako za otroke kot tudi za odrasle bolnike. Njena največja omejitev v vseh kliničnih pogojih in pri vseh starostnih skupinah pa je relativno majhno število kliničnih raziskav, ki bi primerjale uspeh presaditve KMC iz kostnega mozga, periferne krvi in PK.

Glavna prednost presajanja PK je redkost bolezni presadka zoper gostitelja ob siceršnjem neskladju v sistemu HLA, medtem ko je zapozneno prijetje presadka zaradi omejenega števila matičnih celic, še vedno njena glavna slabost. Banke PK dopolnjujejo mednarodne registre tipiziranih dajalcev KMC, ker omogočajo širjenje možnosti alogenske transplantacije. Za razliko od tega imajo zasebne banke PK popolnoma drugačen namen in bodo pokazale svojo dejansko vlogo šele v prihodnosti, v odvisnosti od razvoja regenerativne medicine.

## LITERATURA

1. McGuckin CP, Basford C, Hanger K, Habibollah S, Forraz N. Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Hum Dev* 2007; 83 (12): 733–41.
2. Gluckman E. Umbilical cord blood transplant in human. *Bone Marrow Transplant* 1996;18 (Suppl 2): 166–70.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321 (17): 1174–8.
4. Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P, Lesage S, Portnoi MF, Barbu V, et al. Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1996; 335 (3): 167–70.
5. Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol* 2010; 47 (1): 3–12.
6. Cutler C, Ballen K. Reduced-intensity conditioning and umbilical cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44 (10): 667–71.
7. Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 (7): 555–63.
8. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, Verneris MR, Appelbaum FR, Wagner JE, Delaney C. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010;116 (22): 4693–9.
9. Brunstein CG, Weisdorf DJ. Future of cord blood for oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44 (10): 699–707.
10. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* 2009; 11 (3): 278–88.
11. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46 (2): 200–7.

12. Rocha V, Broxmeyer HE. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16 (1 Suppl): S126–32.
13. Del Toro G., Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid BM, George D, et al. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33 (6): 613–22.
14. Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, Raiola AM, Ibatoci A, Piaggio G, et al. Direct intra-bone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008; 9 (9): 831–9.
15. Anon. Stem cells – The hype & hope – World analysis 2009–2024. London: Visiongain, 2009: 155 pp.
16. Rubinstein P, Taylor PE, Scaradavou A, Adamson JW, Migliaccio G, Emanuel D, et al. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994; 20 (2–3): 587–96.
17. Garcia J. Allogeneic unrelated cord blood banking worldwide: an update. *Transfus Apher Sci* 2010; 42 (3): 257–63.
18. Vidan-Jeras B. Letno poročilo 2013 Slovenija-Donor. Slovenski register prostovoljnih, nesrodnih darovalcev kostnega mozga. Ljubljana, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Center za tipizacijo tkiv, Odsek register Slovenija-Donor, 2006: 12 pp. Dosegljivo na <http://www.ztm.si/register-darovalcev/slovenija-donor>.
19. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica* 2009; 94 (4): 451–4.
20. Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *Br J Haematol* 2009; 147 (2): 192–9.
21. Anon. International standards for cellular therapy product collection, processing, and administration. 4<sup>th</sup> ed. Foundation for the accreditation of cellular therapy (FACT) and Joint accreditation committee – ISCT and EBMT (JACIE), 2008.
22. Katz G, Mills A. Cord blood banking in France: reorganising the national network. *Transfus Apher Sci* 2010; 42 (3): 307–16.
23. Querol S, Mufti GJ, Marsh SG, Pagliuca A, Little AM, Shaw BE, et al. Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? *Haematologica* 2009; 94 (4): 536–41.
24. Koh M, Goh Y, Tan P, Koh L, Hwang W, Loh Y, et al. Stem cell transplantation programme at Singapore general hospital. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 (Suppl 1): S121–4.
25. Anon. WMDA Policy statement on the utility of autologous or family cord blood unit storage. The WMDA board, 2006.
26. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14 (3): 356–63.
27. Nietfeld JJ, Pasquini MC, Logan BR, Verter F, Horowitz MM. Lifetime probabilities of hematopoietic stem cell transplantation in the U.S. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14 (3): 316–22.
28. The European group on ethics in science and new technologies to the European commission. Opinion no. 19 – 16/03/2004 – Ethical aspects of umbilical cord blood banking. European Commission, 2005.
29. Anon. ASBMT position statement. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; (14): 364.
30. Hollands P, McCauley C. Private cord blood banking: current use and clinical future. *Stem Cell Rev* 2009; 5 (3): 195–203.

31. Anon. Stem cell donor registries annual report 2009. World Marrow Donor Association, 2010: 37 pp.
32. Stanevsky A, Shimoni A, Yerushalmi R, Nagler A. Double umbilical cord blood transplant: more than a cell dose? *Leuk Lymphoma* 2010; 51 (6): 975–82.
33. Wall DA, Carter SL, Kernan NA, Kapoor N, Kamani NR, Brochstein JA, et al. Busulfan/melphalan/antithymocyte globulin followed by unrelated donor cord blood transplantation for treatment of infant leukemia and leukemia in young children: the Cord blood transplantation study (COBLT) experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11 (8): 637–46.
34. Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol* 2006; 18 (5): 565–70.
35. Gluckman E, Koepler G, Rocha V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin Hematol* 2005; 42 (2): 85–90.
36. Gluckman E. Cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12 (8): 808–12.
37. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003; 15; 101 (6): 2137–43.
38. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007; 110 (7): 2749–56.
39. Boncimino A, Bertaina A, Locatelli F. Cord blood transplantation in patients with hemoglobinopathies. *Transfus Apher Sci* 2010; 42 (3): 277–81.
40. Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD, Nagler A, Loewenthal R, Rechavi G, et al. Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor. *Am J Hematol* 2004; 77 (4): 397–9.
41. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, Bierings M, Harris RE, Wagner J, et al. Results of unrelated cord blood transplant in Fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13 (9): 1073–82.
42. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24 (5): 1294–301.
43. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, et al. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 2005; 15 (7): 539–47.
44. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; 21 (8): 1733–8.
45. Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, et al. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 2006; 38 (3): 771–3.
46. Arien-Zakay H, Nagler A, Galski H, Lazarovici P. Neuronal conditioning medium and nerve growth factor induce neuronal differentiation of collagen-adherent progenitors derived from human umbilical cord blood. *J Mol Neurosci* 2007; 32 (3): 179–91.
47. Ruvinov E, Sharabani-Yosef O, Nagler A, Einbinder T, Feinberg MS, Holbova R, et al. Transplantation of genetically engineered cardiac fibroblasts producing recombinant human erythropoietin to repair the infarcted myocardium. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1 (1): 7.
48. Arien-Zakay H, Lecht S, Bercu MM, Amarioglio N, Rechavi G, Galski H, et al. Interferon-gamma-induced neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived progenitors. *Leukemia* 2009; 23 (10): 1790–800.

49. Greco N, Laughlin MJ. Umbilical cord blood stem cells for myocardial repair and regeneration. *Methods Mol Biol* 2010; 660: 29–52.
50. Ichim TE, Solano F, Lara F, Rodriguez JP, Cristea O, Minev B, et al. Combination stem cell therapy for heart failure. *Int Arch Med* 2010; 3 (1): 5.
51. Sodian R, Schaefermeier P, Abegg-Zips S, Kuebler WM, Shakibaei M, Daebritz S, et al. Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves. *Ann Thorac Surg* 2010; 89 (3): 819–28.
52. Balan S, Kale VP, Limaye LS. A large number of mature and functional dendritic cells can be efficiently generated from umbilical cord blood-derived mononuclear cells by a simple two-step culture method. *Transfusion* 2010; 50 (11): 2413–23.
53. Parazzi V, Lazzari L, Rebullia P. Platelet gel from cord blood: a novel tool for tissue engineering. *Platelets* 2010; 21 (7): 549–54.
54. De Bruyn C, Delforge A, Martiat P, Bron D. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells: cord blood versus mobilized peripheral blood. *Stem Cells Dev* 2005; 14 (4): 415–24.
55. Ayello J, van d, V, Cairo E, Hochberg J, Baxi L, Satwani P, Cairo MS. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp Hematol* 2009; 37. (10): 1216–29.
56. Požnenel P, Rožman P. Kri iz epruvete – gojenje eritrocitov *in vitro*. *Zdrav Vestn* 2014, sprejeto v objavo.
57. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 2008; 87 (4): 339–50.
58. Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje. UL RS 2007; 61 (07).
59. Rožman P, Jazbec J, Domanović D. Presaditve matičnih celic iz popkovnične krvi – dve desetletji kliničnih izkušenj. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 413–21.