

Učinak kriopohrane na preživljenje krvotvornih matičnih stanica i subpopulacija leukocita prikupljenih iz periferne krvi postupkom leukaferenze

Rimac, Vladimira

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:717566>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Vladimira Rimac

**UČINAK KRIPOHRANE NA
PREŽIVLJENJE KRVOTVORNIH
MATIČNIH STANICA I SUBPOPULACIJA
LEUKOCITA PRIKUPLJENIH IZ
PERIFERNE KRVI POSTUPKOM
LEUKAFEREZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Vladimira Rimac

**UČINAK KRIPOHRANE NA
PREŽIVLJENJE KRVOTVORNIH
MATIČNIH STANICA I SUBPOPULACIJA
LEUKOCITA PRIKUPLJENIH IZ
PERIFERNE KRVI POSTUPKOM
LEUKAFEREZE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Ines Bojanić
Prof. dr. sc. Sanja Dabelić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Vladimira Rimac

**THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION
ON RECOVERY OF HEMATOPOETIC
STEM CELLS AND LEUKOCYTES
SUBPOPULATION COLLECTED FROM
PERIPHERAL BLOOD BY
LEUKAPHERESIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Assistant Professor Ines Bojanić, PhD
Professor Sanja Dabelić, PhD

Zagreb, 2023

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Doktorski rad izrađen je pod mentorstvom doc. dr. sc. Ines Bojanić i prof. dr. sc. Sanje Dabelić u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, a u sklopu Poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

ZAHVALE

Ovaj doktorat za mene je ostvarenje sna. Iako je bilo mnogo padova i uspona, do cilja su me vodili dragi ljudi i kolege kojima se od srca zahvaljujem.

Najveću zahvalu dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ines Bojanić, koja me prihvatila kao punopravnog člana svoga tima i otvorila mi vrata u svijet transplantacije krvotvornih matičnih stanica i stanične terapije. Hvala za podršku, sve ideje i savjete tijekom izrade ovog doktorskog rada. A najveća hvala što imate potpuno povjerenje u mene. Ova disertacija je veliki dio našeg zajedničkog znanstvenog puta kojem nema kraja!

Veliko hvala i mentorici prof. dr. sc. Sanji Dabelić na svim savjetima, motivaciji i podršci te stručnoj pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Hvala izv. prof. dr. sc. Branki Golubić Ćepulić koja je podržala ideju za izradu ovog rada, te bila na raspolaganju kada god sam trebala njezinu stručnu pomoć.

Zahvaljujem svim svojim suradnicima, djelatnicima Odjela za prikupljanje stanica i Odjela za pohranu stanica koji su uvijek bili na raspolaganju kad god sam trebala njihovu pomoć tijekom izrade praktičnog dijela rada.

Veliko hvala mojim najbližim bivšim i sadašnjim suradnicama Odjela za kontrolu kvalitete tkiva i stanica, posebno ing. Ivani Ćorluka i ing. Josipi Marić koje su mi u svakom trenutku bile na raspolaganju i uvelike doprinijele izradi praktičnog dijela moje doktorske disertacije.

Hvala i mojoj dragoj kolegici mag. Koraljki Gojčeta, koja je uvijek bila uz mene, i bila potpora tijekom cijelog procesa izrade mog doktorskog rada.

Na ovom putu u svakom trenutku pratila me moja najdraža znanstvenica Ivana, koja mi je svojim stručnim i znanstvenim savjetima uvijek pomagala kad sam se našla pred zidom. A najvažnije što mi je uvijek pružala ruku kad sam posrnula i vodila me prema ostvarenju ovog mog cilja. Prijateljice, hvala Ti što si uvijek tu!

Bez podrške mojih najmilijih ovo ne bih uspjela. Suprugu Matku i sinu Franu od srca zahvaljujem na strpljenju, neizmjernoj podršci i neiscrpnoj motivaciji tijekom cijelog procesa izrade doktorske disertacije, ali i tijekom naše životne avanture.

Kao i uvijek u životu, uz mene je bio moj brat Branimir, koji me strpljivo slušao kad sam mu objašnjavala svoje muke koje su me zatekle na ovom znanstvenom putu. Hvala Ti na podršci u ovom razdoblju, ali i za sve što smo do sad proživjeli, a još je puno toga lijepoga pred nama!

I za kraj zahvaljujem svojim roditeljima, tati Vladi i mami Dubravki. Zapravo ne postoji toliko veliko hvala koje opisuje moju zahvalnost njima. Od malih nogu učili su me da su upornost i strpljenje ključ uspjeha, a u svakom trenutku mog života bili su mi neizmjerena podrška. Moji roditelji su me učinili osobom kakva jesam! Mama i tata, bez vas ne bih bila doktor znanosti!

SAŽETAK

Zbog očekivanog daljnjeg razvitka i primjene pripravaka za staničnu terapiju, potrebno je poznavati čimbenike koji utječu na vijabilnost i preživljenje stanica nakon kriopohrane. Cilj ovog prospektivnog istraživanja bio je u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka stanica prikupljenih iz periferne krvi leukaferozom odrediti broj živih krvotvornih matičnih stanica (KMS) i subpopulacija leukocita 7-amino aktinomicin D (7-AAD)/aneksin V metodom i standardnom 7-AAD metodom te ispitati utjecaj kriopohrane i različitih čimbenika na preživljenje odmrznutih stanica, a i vremensko razdoblje od odmrzavanja koje je prihvatljivo za određivanje vijabilnosti stanica u svrhu procjene kvalitete pripravaka stanica.

U 30 autolognih i 30 alogenih uzoraka pripravaka stanica *single-platform* metodom određen je broj živih KMS-a, limfocita T i B, NK stanica i monocita. Stabilnost odmrznutih uzoraka ispitana je u tri točke: odmah po odmrzavanju te sat vremena i tri sata nakon odmrzavanja.

Vijabilnosti svih populacija stanica određene 7-AAD/aneksin V metodom bile su statistički značajno niže u odnosu na 7-AAD metodu u svježim i odmrznutim uzorcima autolognih i alogenih pripravaka, no dobivene razlike nemaju utjecaj na laboratorijsku procjenu kvalitete pripravaka KMS.

U autolognim pripravcima kriopohrana najmanje utječe na preživljenje CD3+/CD8+ stanica, a u alogenima na limfocite B (CD19+ stanice). U autolognim i alogenim pripravcima kriopohrana najviše utječe na postotak preživljenja CD34+ stanica, a kod subpopulacija leukocita na preživljenje monocita (CD14+ stanica) i u autolognim i alogenim pripravcima.

U autolognim pripravcima na preživljenje CD3+ i CD3+/CD4+ stanica negativno je utjecala viša koncentracija trombocita, a na preživljenje CD3+/CD8+ stanica duljina pohrane svježeg pripravka prije kriopohrane. U alogenim pripravcima postotak granulocita negativno je utjecao na preživljenje limfocita T.

Ispitivanjem utjecaja kriozaštitne otopine na vijabilnost stanica nakon odmrzavanja dobiveno je da se apsolutni broj živih KMS-a, limfocita B i monocita statistički značajno smanjuje već sat vremena od odmrzavanja te je pripravke s tim vrstama stanice potrebno transplantirati odmah po odmrzavanju.

U ovom istraživanju zapaženo je različito preživljenje KMS-a i subpopulacija leukocita nakon kriopohrane. Stoga bi svaki transplantacijski centar trebao u svojim uvjetima ispitati kako kriozaštitna otopina i ostali čimbenici utječu na vijabilnost i preživljenje stanica od interesa.

Ključne riječi: transplantacija, krvotvorne matične stanice, kriopohrana, stanična terapija, vijabilnost

EXTENDED SUMMARY

Background: Peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation is a widely used therapeutic option in malignant and non-malignant hematological diseases, immunodeficiency as well as some solid tumors and autoimmune diseases. Autologous PBSCs are always cryopreserved immediately after collection, while allogeneic products are usually transplanted fresh unless the cells cannot be delivered to the recipient within 72 hours of collection. The post-thaw cell recovery is influenced by many factors, e.g. cell type, pre-freeze storage conditions, time between collection and cryopreservation, centrifugation, type and concentration of cryopreservation solution, freezing/thawing rate and storage temperature. It is therefore important to examine the effect of the aforementioned factors, especially for allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) products, which have been cryopreserved more frequently as of recently to mitigate the donor and travel risks associated with the COVID-19 pandemic. Cryopreservation of allogeneic products was a challenge for transplant centers because until then it was uninvestigated how the viability of allogeneic products was affected by cryopreservation and thawing. Due to the expansion of cell therapy using not only HSC but also other leukocyte subpopulations in personalized medicine, the influence of these factors on the post-thawed recovery of other cell types needs to be examined to ensure the quality of cell therapy products.

Although the use of cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) is the gold standard in cryopreservation of HSCs, it is well known that it has a negative effect on cell viability during cryopreservation as well as post-thaw. Several studies investigated how cryopreservation affects the post-thaw recovery of HSC and leukocyte subpopulations in PBSC products, while the stability of thawed PBSC samples was investigated only for CD34+ cells, and there are no data on how the length of exposure to DMSO affects viability of other leukocyte subpopulations.

According to the Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (JACIE) standards, viable CD34+ cell count must be analyzed in fresh PBSC products as well as in the thawed cryopreserved samples for graft quality assessment. The method with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) is routinely used to determine viable CD34+ cells by flow cytometry and can also be used to analyze the viability of different subpopulations of leukocytes. However, the limitation of the 7-AAD method is the ability to only determine cells in necrosis and late

apoptosis, but not cells in early apoptosis with an intact cell membrane, which may lead to the overestimation of graft cell viability. However, the cells are already losing functionality in early apoptosis, and the first changes are detected on the cell membrane, resulting in the exposure of phosphatidylserine residues from the inner (cytoplasmic) leaflet to the outer leaflet of the plasma membrane. These changes in early apoptotic cells can be detected by annexin V because it has a high affinity for surface exposed phosphatidylserine.

In order to prevent further loss of viability after thawing, it is recommended to infuse the thawed cell products as soon as possible, preferably within 10 to 20 minutes. However, in some situations, the thawed cell products cannot be transplanted immediately, like in the case of the deterioration of patient's condition, or technical problems during transplantation. Also, there are situations in which the product sample taken for the control of post-thaw viability cannot be delivered immediately to the laboratory. Hence it is important to examine how the length of exposure of the cells to DMSO after thawing affects their viability, as well as to evaluate the sample post-thaw stability to determine the period in which it is possible to accurately assess the quality of the thawed cell product. It is recommended, according to good laboratory practice and International Organization for Standardization (ISO)15189:2012 (Medical laboratories—Requirements for quality and competence), to examine the stability of the samples which will be routinely analyzed to provide guidance for the management of samples for each specific analysis. Due to the expansion of the cell therapy to other leukocyte subpopulations besides CD34+ and CD3+ cells, it is also important to examine the impact of cryopreservation on all leukocyte subpopulations in autologous and allogeneic products for better assessment of the quality of cell products used as immune effector cell therapy.

Aim: The primary aim of this prospective study was to evaluate the post-thaw recovery of HSC and leukocyte subpopulations using the flow cytometry 7-AAD and 7-AAD/annexin V methods. The secondary aim was to assess how the post-thaw recovery is affected by various parameters like the cell composition and concentration in fresh leukapheresis products and the length of time from collection to cryopreservation. The third aim was to examine how the time of exposure to cryoprotective solution containing DMSO after thawing affects the sample stability and viability of HCS and leukocyte subpopulations in autologous and allogeneic PBSC samples. Additionally, the influence of the type of donor, as well as pre-cryopreservation storage time on the post-thaw viability during stability study were evaluated.

Materials and methods

Collection of autologous and allogeneic PBSCs

Thirty autologous and 30 allogeneic PBSC products cryopreserved in the Department of Transfusion Medicine and Transplantation Biology, University Hospital Centre Zagreb were included in the study. Patients (14 males, 16 females) with multiple myeloma (N=21), non-Hodgkin lymphoma (NHL) (N=8) and Hodgkin lymphoma (N=1) collected cells for autologous transplantation using disease-specific chemotherapy and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) filgrastim for mobilization protocols. If there was no adequate increase in the number of CD34+ cells in peripheral blood after mobilization, plerixafor was used as well. For allogeneic transplantation, PBSC products were collected from 7 related and 23 unrelated donors, of which 9 were females and 21 males. The median age of patients for autologous transplantation was 57 years (range 27 – 65 years), while for healthy donors was 32 years (range 21 -59 years).

Peripheral blood stem cells were collected using Spectra Optia apheresis system, CMNC protocol (software 11, Terumo BCT, Colorado, USA). Immediately after the collection, an aliquot of the fresh product was taken for the graft quality assessment.

Cryopreservation procedure

Apheresis products were cryopreserved using cryoprotective solution containing a mixture of 5% human albumin and dimethyl sulfoxide (DMSO) in a final concentration of 10%. The cells were frozen in a controlled programmed freezer Planer Cryo 560-16. After the addition of DMSO, aliquots were taken from each apheresis product for graft analysis. Aliquots and products in cryobags were frozen simultaneously under the same conditions and stored in the vapor phase of liquid nitrogen storage tank. Cryopreserved aliquots were stored for a minimum of 48 hours, and then thawed in a water bath at 37°C for 1-3 minutes.

Immunophenotype analysis

Acquisition and analysis of samples were performed on flow cytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, California) using BD FACS Diva software. Samples were prepared according to the manufacturer's instructions. For each sample 100 000 CD45+ cells were acquired, while samples with low CD45+ cell count were acquired up to maximum of 10 minutes. Before labelling, no sample manipulation (e.g. DMSO removal, erythrocyte lysis) was performed. The modified protocol of International Society of Hematotherapy and Graft

Engineering (ISHAGE) and single-platform method were used for CD34+ cell count determination. Leukocyte subpopulations were determined using single-platform method. Monoclonal antibodies CD3-APC, CD4-PE and CD8-FITC were used for T lymphocytes, CD19-APC for B lymphocytes, while BD Simultest (CD3-FITC, CD56/16-PE) for the determination of NK cells. Monocytes were determined using CD14-PE. The viability detection was performed using both the 7-AAD method and 7-AAD/annexin V methods. All reagents used were from Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, California).

Cells were labelled in duplicate for each sample by adding an equal volume of monoclonal antibodies into BD Trucount Tube and incubating for 15 minutes at room temperature (RT) for fresh leukapheresis samples and at +4°C for thawed samples. Because the leukapheresis sample hematocrit was low, the lyse step was not necessary, so after 15 minutes incubation period, samples were ready for acquisition on flow cytometer.

For the stability study, immediately after thawing 100 µL of sample was taken for analysis. The rest of the sample was stored at 4 °C for further analysis. One and three hours after thawing, an aliquot of sample was taken again, and analyses were performed again. The cells were labeled using monoclonal antibodies according to flow cytometry protocols and incubated at +4 °C for 15 minutes, without lysing due to low hematocrit in the samples. Prior to the acquisition on the flow cytometer, phosphate-buffered saline was added to each sample. At all measurement time points, cells were labeled and analyzed in duplicate for each sample.

CFU assay

Cells were plating at a concentration of 1×10^5 nucleated cells/mL in semi-solid medium using the MethoCult H4034 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). They were incubated under controlled conditions at a temperature of 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. Colonies were counted after 14 days on a StemVision analyzer (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). The results were expressed as the number of colonies per 1×10^5 seeded nucleated cells.

Results: In autologous PBSC products, monocytes were the most, while B lymphocytes were the least abundant leukocyte subpopulation. No B lymphocytes were found in seven products (six collected from NHL patients and one from multiple myeloma patient), and there were no NK cells in one of them collected from NHL patient. Median storage time for fresh autologous and allogeneic PBSC was 4.5 (IQR 4 – 5) and 27 (IQR 6 - 48) hours, respectively.

Only six (20.0%) autologous and 11 (36.7%) allogeneic PBSC were stored overnight, while others were cryopreserved within 5 hours of collection.

In fresh autologous PBSC samples, for all cell populations the medians of viability were $\geq 99.5\%$ using the 7-AAD method and $\geq 99.4\%$ using the 7-AAD/annexin V method. In thawed samples medians of viability were $\geq 94.2\%$ for the 7-AAD method and $\geq 92.5\%$ for the 7-AAD/annexin V method. Statistical analysis showed a significant difference in cell viability using the 7-AAD and the 7-AAD/annexin V method for all cell populations in both autologous fresh and thawed samples. In allogeneic PBSC products the median of the viability of all cell populations in fresh samples was $\geq 99.3\%$ with the 7-AAD method and $\geq 98.6\%$ with the 7-AAD/annexin V method, while in thawed samples was $\geq 93.9\%$ and $\geq 92.1\%$ for methods with 7-AAD and 7-AAD/annexin V, respectively. A statistically significant difference between the methods for cell viability testing in allogeneic PBSC samples was obtained for all analyzed cell populations, whether it was fresh or thawed sample. In fresh and thawed autologous PBSC samples, the statistically significant difference between total cell counts with two viability methods was observed for all cell populations, while in allogeneic leukapheresis sample results showed statistically significant difference in viability for total cell counts of all populations except for CD16+56+ in fresh samples (P=0.126).

Post-thaw recovery for each individual cell population was calculated using the total number of viable cells determined using both the 7-AAD method and the 7-AAD/annexin V method. In autologous products, cryopreservation has the least effect on the post-thaw recovery of CD3+/CD8+ cells, while in allogeneous products on B lymphocytes (CD19+ cells). In autologous and allogeneic products, cryopreservation has the greatest effect on the recovery of CD34+ cells, as well as on monocytes (CD14+ cells) in both autologous and allogeneic PBSC products.

For autologous PBSC samples statistical analysis showed significant differences between recoveries for CD34+ cells (P<0.001), CD19+ cells (P=0.037), CD14+ cells (P<0.001) and CD16+/56+ cells (P=0.002). In allogeneic PBSC samples statistically significant differences were found between post-thaw recoveries for CD34+ and CD16+/56+ cells, P=0.002 and P=0.001, respectively. A weak correlation was obtained between the CD34+ cell recovery and recovery of CFU colonies (7-AAD method: P = 0.021, correlation coefficient 0.298; 7-AAD/annexin V method P = 0.043, coefficient correlation 0.262).

In autologous products we observed weak negative correlation between platelets and CD3+ cell recovery when viable cells were determined with the 7-AAD method ($P=0.042$, $r^2 = -0.374$), and platelets and CD3+/CD4+ cell recovery when viable cells were determined using the 7-AAD/annexin V method ($P=0.043$, $r^2 = -0.372$). The correlations between storage time and recovery of CD3+/CD8+ cells were weak negative using the 7-AAD method ($P=0.028$, $r^2 = -0.401$) and the 7-AAD/annexin V method ($P=0.028$, $r^2 = -0.401$). In allogeneic products, strong negative correlation was observed between percentage of granulocytes in fresh samples, and T cell subpopulations recoveries CD3+ cells: $P<0.001$, $r^2 = -0.759$ for the 7-AAD method, $P<0.001$, $r^2 = -0.768$ for the 7-AAD/annexin V method; CD3+/CD8+ cells: $P=0.001$, $r^2 = -0.668$ for the 7-AAD method, $P=0.001$, $r^2 = -0.666$ for the 7-AAD/annexin V method; CD3+/CD4+ cells: $P<0.001$, $r^2 = -0.718$ for the 7-AAD method, $P<0.001$, $r^2 = -0.720$ for the 7-AAD/annexin V method.

In stability study analysis of the viable absolute cell count showed a statistically significant difference between all measurement points for CD34+ ($P<0.001$), CD14+ ($P<0.001$) and CD19+ cells ($P<0.001$). For the absolute count of viable CD16+/56+ cells, the results after three hours were significantly different from the baseline results ($P=0.002$) as well as the results after one hour ($P=0.007$). In T-lymphocyte subpopulations statistically significant difference was observed between baseline results and the results obtained one-hour post-thaw ($P=0.010$), as well as between baseline and three hours' post-thaw ($P<0.001$) for absolute count of viable CD3+ cell. However, comparing the percentages of post-thaw viable cells, statistically significant difference was observed for the results between one and three hours ($P=0.003$). Statistically significant difference was observed for viable absolute CD3+/CD8+ cells for results obtained immediately after thawing and those after one ($P<0.001$) and three hours ($P<0.001$), as well as for the percentage of viable CD3+/CD8+ cells between the results after three hours compared to the other two measurement points (baseline vs. after three hours $P=0.043$, after one hour vs. after three hours $P=0.003$). Statistically significant difference was observed between baseline and after three hours results for absolute count of CD3+/CD4+ cells ($P<0.001$).

The composition of autologous and allogeneic products differed depending on the type of leukocyte subpopulations. The absolute count of viable CD14+ cells and the T-lymphocyte subpopulation were higher in autologous products compared to allogeneic products, while allogeneic products contained a higher number of viable CD34+, CD19+ and CD16+/56+ cells compared to autologous products. The percentage of viable CD19+ cells as well as

absolute viable CD19+ cells were significantly different between autologous and allogeneic PBSC samples in all measurement time points (baseline $P < 0.001$, after one-hour $P < 0.001$, after three hours $P < 0.001$). Significant difference was obtained for the absolute count of viable CD14+ and CD16+/56+ cells in all measurement time points, and after one hour results for the percentage of viable CD14+ cells ($P = 0.019$). Baseline results for percentage of viable CD3+, CD3+/CD8+ and CD3+/CD4+ cells showed statistically significant difference between autologous and allogeneic samples. Also, significant differences were observed for absolute viable CD3+ cells ($P = 0.016$) and CD3+/CD8+ cells ($P = 0.031$) one-hour post-thaw.

Post-thaw stability of allogeneic cryopreserved PBSC samples were analyzed between leukapheresis products stored up to 24 hours ($N = 20$), and those stored more than 24 hours before cryopreservation ($N = 10$). No statistically significant differences were observed for none of the viable absolute cell counts in all leukocyte subpopulations, except for viable CD3+/CD4+ cells determined after three hours' post-thaw ($P = 0.028$). Statistically significant differences were observed in percentage of viable CD14+, CD19+ and CD16+/56 cells for baseline results, as well as in percentage of viable CD16+/56+ cells one hour after thawing. In analysis of T-lymphocyte subpopulations, statistically significant difference was obtained for the percentage of viable cells between all measurement time points.

Conclusions: Although the differences between results obtained using the 7-AAD/annexin V method compared to the 7-AAD method were statistically significant, they did not influence the laboratory graft quality assessment, and the use of the 7-AAD method was shown to be suitable enough for determining the cell viability and assessing post-thaw cell recovery in the routine quality control of PBSC samples. Due to the increasing need for the use of various types of cell therapy, it is necessary to further identify the factors affecting the cell viability and post-thaw recovery, such as the characteristic of the apheresis products and pre-freeze storage conditions which can adversely affect the quality of the graft. The results showed that cryopreservation had different effects on viability and stability of various leukocyte subpopulations in thawed PBSC samples. The type of donors, as well as the length of storage before cryopreservation did not affect cryopreserved PBSC sample post-thawing stability. In PBSC samples the viability of HSC, T and B lymphocytes, monocytes and NK cells significantly decreased immediately post-thawing, therefore cellular products containing them must be infused immediately after thawing in order to prevent the further loss of cell viability and preserve the quality of the graft. Since different viabilities and post-thaw recoveries of leukocyte subpopulations were observed in our study, the transplantation centers should

evaluate how cryopreservation and other factors affect the viability and recovery of each cell population of interest in their settings.

Key words: cell therapy, cell viability, peripheral blood stem cells, cryopreservation

POPIS KRATICA

7-AAD	7-aminoaktinomicin D
ACD-A	sterilna otopina limunske kiseline, natrijevog citrata i dekstroze (engl. <i>acid citrate dextrose</i>)
Ann V	aneksin V
CAR-T	terapija T-stanicama s kimeričnim antigenskim receptorima (engl. <i>chimeric antigen receptor T-cells</i>)
CFU	test kratkotrajne kulture stanica (engl. <i>colony-forming unit</i>)
CG	katepsin G (engl. <i>cathepsin G</i>)
DLI	infuzija donorskih limfocita (engl. <i>donor lymphocyte infusion</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DPPI	dipeptidil peptidaza I (engl. <i>dipeptidyl peptidase I</i>)
FITC	fluorescein izotiocijanat (engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FS	fosfatidilserin
FSC	prednje raspršenje (engl. <i>forward scatter</i>)
G-CSF	čimbenika rasta granulocitnih kolonija (engl. <i>granulocyte colony stimulating factor</i>)
GvHR	reakcija presatka protiv domaćina (engl. <i>graft versus-host reaction</i>)
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IQR	interkvartilni raspon
ISHAGE	engl. <i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
JACIE	Međunarodni standardi za staničnu terapiju (engl. <i>Joint Accreditation Committee of International Society of Cellular Therapy and the European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>)
kDa	kilo Dalton
KMS	krvotvorne matične stanice
LVL	leukaferenza velikog volumena krvi (engl. <i>large volume leukapheresis</i>)
mAt	monoklonsko protutijelo
MMP9	matriks metaloproteinaza 9 (engl. <i>matrix metalloprotease 9</i>)
NE	neutrofilna elastaza (engl. <i>neutrophil elastase</i>)
NHL	ne-Hodgkinov limfom (engl. <i>non-Hodgkin limfoma</i>)
NK stanice	prirodne stanice ubojice (engl. <i>natural killer cells</i>)

PE	fikoeritrin (engl. <i>phycoerythrin</i>)
PI	propidij jodid
Rs	Spearmanov koeficijent korelacije
SCF	faktor matičnih stanica (engl. <i>stem cell factor</i>)
SDF-1	čimbenik stanične strome 1 α (engl. <i>stromal-cell-derived factor 1</i>)
SSC	bočno raspršenje (engl. <i>side scatter</i>)
TT	tjelesna težina
VCAM-1	vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VLA-4	engl. <i>very late antigen 4</i>
WMDA	<i>World Marrow Donor Association</i>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica	1
1.2. Krvotvorne matične stanice.....	2
1.2.1. CD34 antigen.....	3
1.3. Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi.....	4
1.3.1. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv.....	4
1.3.1.1. Čimbenik rasta granulocitnih kolonija	5
1.3.1.2. Pleriksafor	6
1.3.2. Postupak prikupljanja krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi	7
1.4. Stanična terapija	9
1.5. Kriopohrana pripravaka stanica	10
1.5.1. Postupci obrade i pohrana prije kriopohrane (engl. <i>prefreeze processing</i>).....	11
1.5.2. Dodavanje kriozaštitne otopine.....	11
1.5.3. Zamrzavanje	12
1.5.4. Pohrana.....	13
1.5.5. Odmrzavanje	13
1.6. Kontrola kvalitete pripravaka stanica.....	15
1.6.1. Testovi za procjenu kvalitete pripravka	15
1.6.1.1. Metode za određivanje krvotvornih matičnih stanica	16
1.6.1.2. Metode za određivanje subpopulacija leukocita	19
1.6.1.3. Metode za određivanje vijabilnosti stanica protočnom citometrijom	19
1.6.1.4. Test određivanja broja krvotvornih granulocitno-makrofagnih kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica	20
1.7. Utjecaj kriopohrane na preživljenje stanica prikupljenih leukaferozom.....	21
1.8. Kratkotrajna stabilnost odmrznutih kriopohranjenih stanica	23
2. OBRAZLOŽENJE TEME, HIPOTEZA i CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3. ISPITANICI I METODE.....	27
3.1. Ispitanici	27
3.1.1. Izračun snage studije	27
3.2. Metode.....	28
3.2.1. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv.....	28
3.2.2. Prikupljanje stanica postupkom leukaferoze	28

3.2.3. Kriopohrana pripravaka stanica	29
3.2.4. Odmrzavanje i postupanje s uzorkom pripravaka stanica nakon odmrzavanja	30
3.2.5. Određivanja parametara kompletne krvne slike	30
3.2.6. Imunofenotipizacija stanica.....	30
3.2.6.1. Određivanje krvotvornih matičnih stanica	31
3.2.6.2. Određivanje subpopulacija leukocita	31
3.2.6.3. Određivanje vijabilnosti stanica	31
3.2.6.4. Postupak obilježavanja stanica.....	31
3.2.6.4.1. Obilježavanje krvotvornih matičnih stanica.....	31
3.2.6.4.2. Obilježavanje subpopulacija leukocita.....	33
3.2.6.5. Analiza uzoraka na protočnom citometru	33
3.2.7. Test kratkotrajne kulture stanica	36
3.2.8. Izračun ukupnog broja živih stanica u pripravcima leukaferoze	36
3.2.9. Izračun preživljenja stanica nakon kriopohrane	36
3.2.10. Ispitivanje stabilnosti odmrznutih kriopohranjenih uzoraka	37
3.2.11. Statistička obrada podataka	37
4. REZULTATI.....	39
4.1. Obilježja davatelja krvotvornih matičnih stanica.....	39
4.2. Obilježja svježih autoloških i alogenih stanica prikupljenih leukaferozom	40
4.3. Usporedba rezultata vijabilnosti stanica nakon kriopohrane dobivenih određivanjem standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom te usporedba postotka preživljenja stanica kod autoloških pripravaka	43
4.4. Usporedba rezultata vijabilnosti stanica nakon kriopohrane dobivenih određivanjem standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom te usporedba postotka preživljenja stanica kod alogenih pripravaka	46
4.5. Povezanosti preživljenja KMS-a i subpopulacija leukocita s obilježjima autoloških pripravaka stanica.....	49
4.6. Povezanost preživljenja KMS-a i subpopulacija leukocita s obilježjima alogenih pripravaka stanica.....	51
4.7. Povezanost postotka preživljenja CD34+ stanica s postotkom preživljenja kolonija u testu kratkotrajne kulture stanica (CFU test) u uzorcima autoloških i alogenih pripravaka stanica.....	53
4.8. Rezultati ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autoloških i alogenih pripravaka stanica	54

4.8.1. Usporedba rezultata ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja između uzoraka autolognih i alogenih pripravka stanica	68
4.8.2. Utjecaj vremena pohrane svježih alogenih pripravaka i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja na vijabilnosti stanica 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom	71
5. RASPRAVA.....	74
6. ZAKLJUČCI.....	85
7. POPIS LITERATURE.....	88
8. ŽIVOTOPIS.....	100

1. UVOD

1.1. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (KMS) najrašireniji je oblik imunoterapije i već se više od 60 godina koristi u liječenju malignih bolesti krvotvornog i imunskog sustava, kao i nekih solidnih tumora, a u novije vrijeme i u liječenju autoimunih bolesti (1).

Ovisno o vrsti davatelja, transplantacija KMS-a može biti autologna, pri kojoj se bolesniku reinfundiraju njegove vlastite stanice, ili pak alogena u kojoj se bolesniku infundiraju KMS prikupljene od zdravog davatelja.

Prva transplantacija KMS-a učinjena je krajem pedesetih godina dvadesetog stoljeća, a izvor je bila koštana srž (2). U Republici Hrvatskoj prva transplantacija alogene koštane srži učinjena je 1983. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Uz napredak tehnologije i razvoj medicinske znanosti, izvor KMS-a postala je i periferna krv u koju se KMS iz koštane srži mobiliziraju primjenom čimbenika rasta granulocitnih kolonija (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF). Sredinom 80-ih godina 20. stoljeća izvedene su prve transplantacije autoloških KMS-a prikupljenih iz periferne krvi dok je prva alogena transplantacija KMS-a iz periferne krvi učinjena 1993. godine (3-5). Uz navedeno, 1989. godine krv iz pupkovine postala je još jedan izvor KMS-a (6). Prednost krvi iz pupkovine je sadržaj velikog broja nezrelih imunskih stanica što znači da postoji manja mogućnost nastanka reakcije presatka protiv domaćina (engl. *graft versus-host reaction*, GvHR) u odnosu na transplantaciju KMS iz koštane srži ili periferne krvi. Krvotvorne matične stanice krvi iz pupkovine imaju snažniju sposobnost obnavljanja hematopoeze u odnosu na stanice iz ostala dva poznata izvora KMS-a što se također pripisuje njihovoj nezrelosti (7). No ograničavajući faktor je volumen krvi iz pupkovine te je u konačnici ukupan broj KMS-a za transplantaciju manji u odnosu na onaj prikupljen iz periferne krvi, odnosno punkcijom koštane srži. Stoga se krv iz pupkovine najčešće koristi u transplantacijama u pedijatrijskoj populaciji (8).

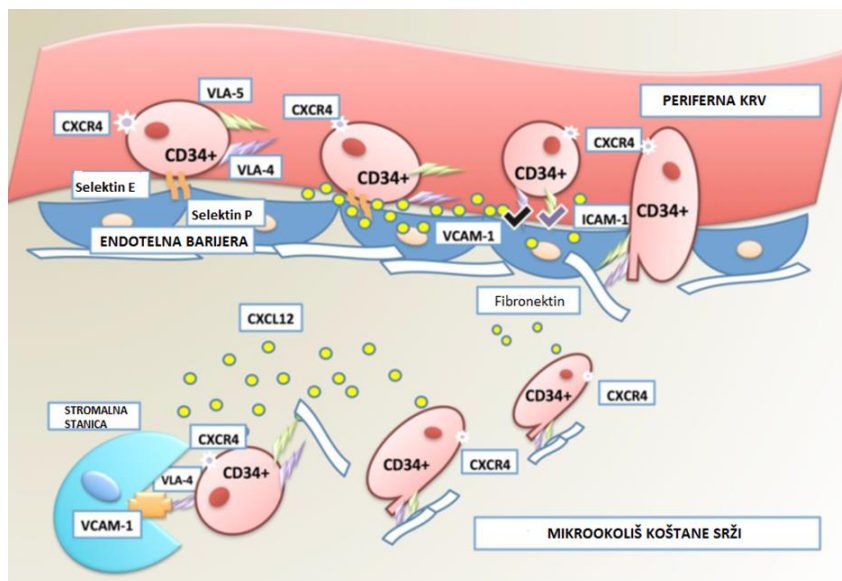
Transplantacija KMS-a iz periferne krvi u današnje je vrijeme široko zastupljena terapijska opcija i u autolognoj i alogenoj transplantaciji (9, 10). Prikupljanje stanica iz periferne krvi staničnim separatorom u odnosu na punkciju koštane srži manje je invazivan postupak jer se provodi bez opće anestezije. U pripravcima iz periferne krvi broj KMS-a veći je nego u pripravcima koštane srži što doprinosi bržem oporavku hematopoeze nakon transplantacije i rezultira bržim oporavkom bolesnika te manjim troškovima zdravstvenog sustava (11, 12). Brzina oporavka hematopoeze nakon transplantacije KMS-a određuje se brojem dana od transplantacije do dana kad koncentracija neutrofila u perifernoj krvi bolesnika dosegne $\geq 0,5$

$\times 10^9/L$, odnosno koncentracija trombocita $\geq 20 \times 10^9/L$ bez transfuzijskog liječenja prethodna tri dana (13).

Autologna transplantacija KMS-a metoda je liječenja pri kojoj bolesnik prima visoke doze kemoterapije i/ili zračenja, što rezultira nepovratnim oštećenjem koštane srži, nakon čega slijedi infuzija prethodno prikupljenih i kriopohranjenih KMS-a samog bolesnika. U alogenoj transplantaciji zamjenjuju se manje vrijedne KMS bolesnika zdravim KMS srodnih ili nesrodnih davatelja (14). Autologna transplantacija, iako je sigurna i ne izaziva učinak presatka protiv tumora (engl. *graft versus tumor effect*), baš zbog toga nema efektivan učinak koji pomaže u uklanjanju agresivnih karcinoma. S druge strane, alogena transplantacija ima određene nedostatke, kao što su bolest presatka protiv primatelja (engl. *graft versus host disease*), infekcije, te toksično oštećenje organa, što rezultira značajnim morbiditetom i smrtnošću (15).

1.2. Krvotvorne matične stanice

Krvotvorne matične stanice su funkcionalno heterogena skupina stanica, s karakteristikama pluripotentnosti, samoobnavljanja (engl. *self-renewal*) te mogućnošću obnavljanja cijelog hematopoetskog sustava (1, 16). Citoadhezivna interakcija između receptora i liganda izraženih na stromalnim stanicama s izvanstaničnim matriksom omogućuje KMS da ostanu u niši koštane srži. Dvije adhezijske molekule važne su za citoadhezivnu interakciju: vaskularna adhezijska molekula VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) i VLA-4 (engl. *very late antigen 4*), kao i kemokin CXCR4, koji se veže na čimbenik stanične strome 1α (engl. *stromal-cell-derived factor 1*, SDF-1) (Slika 1) (17, 18). Interakcija CXCR4 i molekule SDF-1 omogućuje mirovanje KMS-a i njihovo bivanje u niši koštane srži. Ekspresija kemokinskog receptora CXCR4 na površini KMS-a omogućuje udomljavanje (engl. *homing*) stanica u koštanoj srži, kao i migraciju stanica između koštane srži i periferne krvi. Takvu ulogu imaju i međustanična adhezijska molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) i VCAM-1, dok su za pokretanje stanica unutar koštane srži značajne molekule selektin E i selektin P (17).



Slika 1. Pokretanje i udomljavanje krvotvornih matičnih stanica u mikrookolišu koštane srži (preuzeto i prilagođeno prema 17). Citoadheziivna interakcija između receptora i liganda izraženih na stromalnim stanicama s izvanstaničnim matriksom u kojoj važnu ulogu imaju vaskularna adhezijska molekula VCAM-1, VLA-4, te kemokin CXCR4, koji se veže na čimbenik stanične strome 1α (engl. stromal-cell-derived factor 1, SDF-1).

1.2.1. CD34 antigen

Antigen CD34 je glikozilirani transmembranski protein tipa I (obitelj sijalomucina) izražen na ranim oblicima limfohematopoetskih matičnih i progenitorskih stanica, na endotelnim stanicama malih krvnih žila i embrionalnim fibroblastima. U koštanoj srži zdrave osobe samo 1,5 % mononuklearnih stanica ima izražen CD34 antigen, dok je u perifernoj krvi taj biljeg izražen na manje od 0,5 % stanica (19).

Molekula CD34 ima glikoziliranu strukturu sličnu mucinu, a molekularna masa mu je 110 – 120 kilo Daltona (kDa), s polipeptidnim ostatkom kojemu je masa približno 40 kDa (20). Takva struktura molekule ima važnu ulogu kod odabira odgovarajućega klona protutijela koji se veže za CD34 antigen i omogućuje analizu CD34 pozitivnih stanica protočnom citometrijom.

Epitopi koje prepoznaje CD34 monoklonsko (mAt) protutijelo mogu se podijeliti u tri klase, ovisno o njihovoj osjetljivosti na enzime neuraminidazu (sijalidazu) i glikoproteazu. Epitopi klase I osjetljivi su na aktivnost oba enzima, i nisu prikladni za dijagnostiku jer su epitopi ove klase izraženi samo kod nekih oblika CD34 molekula. Monoklonska protutijela usmjerena na

epitope klase II (osjetljivi na glikoproteaze a nisu osjetljivi na neuraminidazu) i klase III (nisu osjetljivi na glikoproteazu niti na neuraminidazu) prepoznaju sve glikoforme CD34 molekule te su takva protutijela pogodna za analizu stanica koje imaju izražen antigen na površini (20). Za potrebe kontrole kvalitete transplantata KMS-a najčešće se koristi mAt klon 8G12 obilježeno fluorokromom fikoeritriinom (engl. *phycoerythrin*, PE) koje je usmjereno na epitope klase III (21-23).

1.3. Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi

Krvotvorne matične stanice prikupljaju se iz periferne krvi postupkom leukaferoze nakon mobilizacije primjenom mijelosupresivne kemoterapije i/ili krvotvornih faktora rasta, što dovodi do povećanja broja krvotvornih prastanica u perifernoj krvi davatelja (24). Pripravci stanica prikupljeni iz periferne krvi sadrže uz KMS i zrele imunosne stanice od kojih se očekuje učinak presatka protiv leukemije/tumora, ali koje dovode i do imunosne reakcije GvHR. Subpopulacije leukocita prikupljene postupkom leukaferoze u novije vrijeme dobivaju još više na važnosti jer se pripravci koji sadrže spomenute vrste stanica koriste kao ishodišni pripravci za staničnu terapiju.

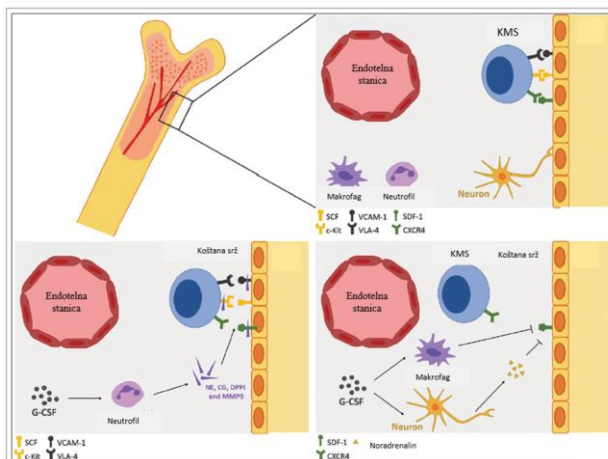
1.3.1. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv

Prije prikupljanja KMS-a za autolognu transplantaciju bolesnici primaju citotoksičnu kemoterapiju, a vrsta i broj ciklusa ovisi o dijagnozi, nakon čega slijedi primjena G-CSF-a sa svrhom mobilizacije što većeg broja KMS-a iz koštane srži u perifernu krv.

Citotoksični lijekovi oštećuju stanice koštane srži što za posljedicu ima povećano umnažanje preostalih KMS-a kako bi se koštana srž čim prije oporavila i uspostavila se normalna hematopoeza, a to ujedno doprinosi i uspješnijoj mobilizaciji KMS-a u perifernu krv nakon primjene G-CSF-a (14). Kinetika mobilizacije KMS-a u prikupljanju stanica za autolognu transplantaciju ovisi o mobilizacijskom protokolu koji je specifičan za dijagnozu, ali ovisi i o dobi bolesnika, stupnju oštećenja koštane srži osnovnom bolešću i prethodnom citotoksičnom terapijom.

1.3.1.1. Čimbenik rasta granulocitnih kolonija

Čimbenik rasta granulocitnih kolonija uzrokuje hiperplaziju mijeloidne loze, aktivira neutrofile koji posljedično otpuštaju proteolitičke enzime: neutrofilnu elastazu (engl. *neutrophil elastase*, NE), katepsin G (engl. *cathepsin G*, CG), dipeptidil peptidazu I (engl. *dipeptidyl peptidase I*, DPPI) i matriks metaloproteinazu 9 (engl. *matrix metalloproteinase 9*, MMP9) (11, 25). Ti proteolitički enzimi nakupljaju se u koštanoj srži i razgrađuju molekule VCAM-1, SDF-1 i c-Kit, što dovodi do prekida interakcije između molekula VLA-4, CXCR4 i faktora matičnih stanica (engl. *stem cell factor*, SCF) s posljedicom mobilizacije KMS-a iz koštane srži u perifernu krv. Nadalje, G-CSF aktivira simpatičke neurone u koštanoj srži vezanjem na G-CSF receptore, i na taj način doprinosi otpuštanju noradrenalina koji smanjuje ekspresiju molekule SDF-1 na osteoblastima, i omogućuje mobilizaciju KMS-a (Slika 2).



Slika 2. Prikaz djelovanja čimbenika rasta granulocitnih kolonija (G-CSF-a) u mobilizaciji krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv (preuzeto i prilagođeno prema 11).

Priprema autogenih i alogenih davatelja za prikupljanje KMS-a iz periferne krvi uključuje primjenu G-CSF-a te se nakon pet dana od primjene prve doze u perifernoj krvi očekuje porast KMS-a za 50 do 100 puta u odnosu na broj KMS-a prije mobilizacije. Stoga je G-CSF zlatni standard u mobilizaciji stanica iz koštane srži u perifernu krv u svrhu prikupljanja KMS-a za transplantaciju (11).

U mobilizacijskom protokolu najčešće se primjenjuje granulocitni faktor rasta filgrastim, rekombinantni ljudski G-CSF, koji se daje subkutano. Preporučena doza u pripremi bolesnika za prikupljanje autogenih KMS-a je 10 µg po kilogramu tjelesne težine (kg/TT) bolesnika

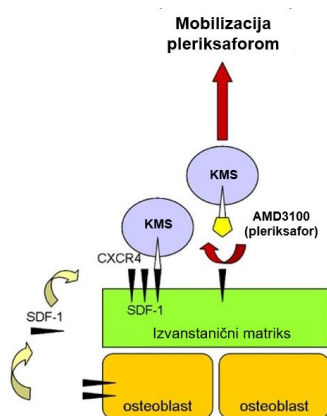
dnevno kroz pet do sedam dana, odnosno 10 - 15 µg/kg TT zdravog davatelja kroz četiri do pet dana u pripremi za prikupljanje alogenih pripravaka KMS-a (25). Primjena G-CSF-a traje sve dok se ne prikupi dovoljno CD34+ stanica za transplantaciju, a potrebna koncentracija KMS-a ovisi o dijagnozi primatelja.

Uspješnost mobilizacije KMS-a iz koštane srži u perifernu krv utvrđuje se određivanjem koncentracije CD34+ stanica u perifernoj krvi davatelja. U bolesnika koji primaju kemoterapiju kao dio mobilizacijskog protokola najčešće dolazi do aplazije i koncentracija leukocita u perifernoj krvi iznosi manje od $1 \times 10^9/L$. Kada koncentracija leukocita počne rasti i dosegne vrijednost višu od $1 \times 10^9/L$, određuju se CD34+ stanice. Kada je koncentracija CD34+ stanica veća od $10 \times 10^6/L$ u perifernoj krvi počinje prikupljanje KMS-a postupkom leukaferenze.

1.3.1.2. Pleriksafor

U određenog postotka bolesnika koji se pripremaju za prikupljanje autolognih KMS-a iz periferne krvi, ne dolazi do očekivanog porasta broja CD34+ stanica (tzv. slabi mobilizatori), najčešće zbog toga što su prethodno primili velik broj ciklusa kemoterapije ili su zračeni. U tim se slučajevima u svrhu mobilizacije stanica uz G-CSF primjenjuje još jedan agens, pleriksafor, koji dodatno povećava broj KMS-a u perifernoj krvi bolesnika.

Pleriksafor, odnosno molekula AMD-3100 je reverzibilnih inhibitor, antagonist kemokinskog receptora CXCR4 za CD34+ stanice. Kada je receptor CXCR4 povezan s ligandom SDF-1 α , to omogućuje zadržavanje CD34+ stanica u niši koštane srži. No, kad se pleriksafor veže za CXCR4, onemogućuje da KMS ostanu u niši koštane srži i na taj način povećava se broj KMS-a u perifernoj krvi bolesnika (Slika 3) (26, 27). Pleriksafor je inhibitor prijenosa signala između molekula CXCR4 i SDF-1 α te reverzibilno inhibira vezanje SDF-1 na njegov receptor molekulu CXCR4.



Slika 3. Prikaz načina djelovanja pleriksafora (AMD3100) u koštanoj srži (preuzeto i prilagođeno prema 27) .

Krvotvorne matične stanice koje su mobilizirane pleriksaforom u velikom postotku su u G₁ fazi staničnog ciklusa, i pripadaju primitivnoj podklasi CD34⁺ stanica (CD34⁺/CD38⁻ stanice) u usporedbi s onima koje su mobilizirane samo G-CSF-om (12).

Osim što doprinosi povećanju broja CD34⁺ stanica u perifernoj krvi, pleriksafor povećava i apsolutni broj limfocita, te broj stanica svih limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi (limfocite B i T, te NK stanice) (28). Kada se pleriksafor koristi u kombinaciji s G-CSF-om, ta dva agensa imaju zajednički učinak, bez povećanja toksičnosti za bolesnika.

1.3.2. Postupak prikupljanja krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi

Krvotvorne matične stanice prikupljaju se iz periferne krvi postupkom leukaferoze rabeći stanične separatore. Kako su KMS veličinom i specifičnom težinom slične mononuklearnim stanicama, cilj je staničnim separatorom prikupiti što veći broj mononuklearnih stanica. Stanični separatori djeluju na principu izdvajanja stanica raslojenih centrifugiranjem pune krvi kojoj je dodana antikoagulantna otopina. Zbog razlike u specifičnoj težini krvni sastojci raslojavaju se na eritrocite, granulocite, mononuklearne stanice (limfocite i monocite), trombocite i plazmu. Tijekom leukaferoze prikuplja se sloj između granulocita i trombocita, odnosno sloj mononuklearnih stanica, a ostale se stanice vraćaju u bolesnika (14). Ukoliko se prikupljeni pripravak pohranjuje preko noći i bit će kriopohranjen idući dan, dodatno se u postupku leukaferoze prikuplja bolesnikova autologna plazma, te se dodaje u pripravak stanica kako bi se osiguralo da je u pripravku koncentracija leukocita < 200 x 10⁹/L (29, 30).

Za održavanje normalnog tijeka leukaferoze potreban je kontinuirani protok krvi kroz stanični separator brzinom od 50 do 100 mL/min. Ako se venski pristup ne može ostvariti putem

perifernih vena, bolesniku se za potrebe prikupljanja stanica mora postaviti dvoluminalni centralni venski kateter. Kako bi se spriječilo zgrušavanje krvi, u postupku prikupljanja stanica koristi se antikoagulanta otopina dobivena miješanjem otopine citrata ACD-A (engl. *anticoagulant citrate dextrose-A*) i heparina.

Ovisno o volumenu obrađene krvi davatelja i trajanju prikupljanja, postupci leukafereze se mogu podijeliti na standardne i postupke leukafereze velikog volumena. Standardnim postupkom se ukupan volumen krvi davatelja obrađuje dva do tri puta (osam do dvanaest litara krvi), a vrijeme prikupljanja stanica ograničeno je na tri ili četiri sata. Leukaferezom velikog volumena krvi (engl. *large volume leukapheresis*, LVL) ukupan volumen krvi davatelja obradi se više od tri puta (čak i do šest puta), što se postiže produženjem trajanja postupka leukafereze ili povećanjem brzine ulaznog protoka krvi u stanični separator (14). Prednost korištenja postupka LVL je mogućnost obrade većeg volumena krvi davatelja jednim postupkom leukafereze što je važno jer je učinak mobilizacije KMS-a iz koštane srži u perifernu krv prolazan događaj, te je potrebno što preciznije odrediti vrijeme početka prikupljanja KMS-a kao i maksimalno iskoristiti vrijeme za prikupljanje stanica (31).

Priravci stanica za uspješnu transplantaciju trebali bi sadržavati što veći broj živih KMS-a s minimalnim brojem eritrocita i granulocita. Za autolognu transplantaciju potrebno je prikupiti $\geq 3 \times 10^6$ CD34+ stanica/ kg TT bolesnika, dok je za alogenu transplantaciju cilj prikupiti 5×10^6 CD34+ stanica/kg TT primatelja (32-34).

1.4. Stanična terapija

Osim prikupljanja KMS-a, u posljednjih desetak godina postupcima leukaferoze prikupljaju se i ostale subpopulacije leukocita iz periferne krvi za proizvodnju pripravaka za staničnu terapiju, koji se zatim obrađuju ili genetski mijenjaju te se primjenjuju u liječenju sve više različitih vrsta bolesti (35-38). Kriopohrana stanica neizostavan je dio proizvodnje pripravaka za staničnu terapiju jer bi infuzija svježih stanica zahtijevala ili višestruka prikupljanja davateljevih stanica ili neprekidno održavanje kulture genetski promijenjenih stanica do infuzije pripravaka bolesniku (39). U prikupljanju stanica za alogenu transplantaciju često se uz KMS prikupljaju i limfociti T koji se primjenjuju kao imunoterapija nakon transplantacije alogenih KMS-a i profilaktički za sprječavanje povratka bolesti kod bolesnika s visokim rizikom za relaps bolesti (40, 41). Svrha je infuzije donorskih limfocita (engl. *donor lymphocyte infusion*, DLI) povećati učinak presatka naspram tumora (engl. *graft versus-tumor effect*). Za DLI se mogu koristiti ostatni dijelovi alogenih pripravaka stanica ukoliko je za transplantaciju KMS-a prikupljen dovoljan broj CD34+ stanica ili se pripravci mononuklearnih stanica koji sadrže limfocite T mogu zasebno prikupljati. Koncentracija mononuklearnih stanica u perifernoj krvi zdravog davatelja dovoljna je za prikupljanje pripravaka za staničnu terapiju, te nije potrebna mobilizacija stanica iz koštane srži u perifernu krv prije početka leukaferoze.

U novije vrijeme terapija T-stanicama s kimeričnim antigenskim receptorima (engl. *chimeric antigen receptor T-cells*, CAR-T) doprinijela je napretku personalizirane medicine u bolesnika s malignim hematološkim bolestima, ali i liječenju solidnih tumora, autoimunih i zaraznih bolesti (42). Nakon prikupljanja, stanice bolesnika se genetički mijenjaju i umnažaju *ex vivo* te najčešće kriopohranjuju (15, 43).

Kako bi se mogla planirati proizvodnja stanične terapije, pripravci stanica prikupljeni leukaferozom najčešće se kriopohranjuju u transplantacijskom centru u kojemu se prikupljaju i zamrznuti šalju na proizvodnju. Stoga je važno poznavati u kojoj mjeri postupci kriopohrane i odmrzavanja utječu na vijabilnost i preživljenje (engl. *recovery*) limfocita T i drugih stanica subpopulacija leukocita, kao i genetički promijenjenih stanica u pripravcima za staničnu terapiju.

Kao i u procjeni kvalitete svježih pripravaka KMS-a, u pripravcima mononuklearnih stanica koji se prikupljaju za CAR-T terapiju potrebno je odrediti broj živih limfocita T (CD3+ stanica), jer kvaliteta završnog pripravka stanica za staničnu terapiju ovisi o kvaliteti svježeg pripravka (15, 42).

Osim CAR-T terapije, u svrhu liječenja malignih bolesti primjenjuje se i terapija prirodnim stanicama ubojicama (engl. *natural killer cells*, NK cells). Prirodne stanice ubojice dio su urođenog imunskog sustava, a imaju važnu ulogu u obrani organizma od virusnih bolesti i tumora, jer imaju sposobnost ubijanja tumorskih i zaraženih stanica bez prethodnog izlaganja njima samima. Aktivirane NK stanice mogu djelovati kao efektorske stanice otpuštajući citokine i kemokine za mobiliziranje i aktivaciju limfocita B i T. Aktivacija NK stanica određena je ravnotežom između odgovora inhibitornih receptora i aktivacijskih receptora na membrani NK stanica (39). Približno 90 % NK stanica iz periferne krvi ima izražen biljeg CD16 i slabije izražen biljeg CD56 (CD16⁺/CD56^{dim}), te ih karakterizira snažna citotoksična aktivnost nakon interakcije sa ciljnim stanicama, za razliku od NK stanica koje se nalaze u limfnim čvorovima i tonzilama u kojih je jako izražen biljeg CD56 dok je CD16 slabo izražen ili je negativan (CD56^{bright}CD16^{dim/-}). NK stanice s takvim izražajem biljega imaju slabu citotoksičnu aktivnost, no izlučuju velike količine citokina kao odgovor na stimulaciju interleukinima 2, 15, 18 i interferonima tipa I (44).

Za potrebe stanične terapije NK stanice najčešće se izoliraju iz alogenih pripravaka KMS-a ili iz krvi iz pupkovine te se nasađuju u hranjivi medij uz dodatak različitih faktora rasta i drugih aktivirajućih molekula, kako bi se dobila dovoljna količina stanica u pripravku koji se infundira bolesniku (45, 46). Terapija alogenim haploidentičnim NK stanicama pokazala je učinkovitost na tumore bez izazivanja odbacivanja transplantata ili ozbiljnih nuspojava u bolesnika (47).

1.5. Kriopohrana pripravaka stanica

Pripravci KMS za autolognu transplantaciju moraju se kriopohraniti u najkraćem mogućem roku od završetka prikupljanja. Kako bi se smanjio negativan učinak zamrzavanja na preživljenje stanica, preporuka je da se kriopohrane unutar 48 sati od prikupljanja (48). Pripravci alogenih KMS-a transplantiraju se svježi, ako je moguće organizirati dostavu stanica od davatelja do primatelja unutar 72 sata. U vrijeme COVID-19 pandemije pokazala se potreba i za njihovom kriopohranom, kako bi se osigurala dostupnost bez obzira gdje će ova vrsta pripravaka biti transplantirana (49).

Osim pripravaka KMS-a, kriopohranjuju se i drugi pripravci stanica prikupljeni iz periferne krvi koji sadrže ostale subpopulacije leukocita, kao što DLI pripravak koji se infundira bolesnicima s relapsom bolesti nakon transplantacije, ili limfociti T i monociti koji su ishodišni pripravci za proizvodnju pripravaka za staničnu terapiju (42, 50).

Postupci kriopohrane i odmrzavanja stanica prikupljenih leukaferozom validirani su i standardizirani, no daleko su od optimalnih, jer uzrokuju oštećenja stanične membrane i organela pa ih dio stanica ne preživi i/ili izgubi sposobnost proliferacije (51). Brojni čimbenici utječu na uspješnost preživljenja stanica nakon kriopohrane, među kojima su vrsta i koncentracija kriozaštitne otopine, koncentracija stanica u svježem pripravku, brzina zamrzavanja/odmrzavanja i temperatura pohrane (29, 52).

Protokol kriopohrane stanica može se podijeliti u šest koraka:

1. postupci obrade i pohrana prije kriopohrane
2. dodavanje kriozaštitne otopine
3. zamrzavanje
4. dugotrajna pohrana
5. odmrzavanje
6. procjena kvalitete nakon odmrzavanja (25).

1.5.1. Postupci obrade i pohrana prije kriopohrane (engl. *prefreeze processing*)

Prije kriopohrane, svježi se pripravci stanica kratkotrajno pohranjuju u kontroliranim uvjetima, a ponekad se provodi selekcija subpopulacija ciljanih stanica (npr. imunomagnetska selekcija CD34+ stanica) ili genetička promjena stanica. Bilo koji od tih procesa može utjecati na vijabilnost i preživljenje stanica nakon kriopohrane. Poznato je da na preživljenje stanica nakon kriopohrane utječe koncentracija stanica u svježem pripravku, temperatura i trajanje transporta i pohrane svježeg pripravka, osobito na preživljenje stanica prikupljenih u nekom drugom udaljenom centru.

1.5.2. Dodavanje kriozaštitne otopine

Za kriopohranu KMS-a najčešće se koristi kriozaštitna otopina koja sadrži dimetil sulfoksid (DMSO). Iako se istražuju i u manjoj mjeri i koriste različite kriozaštitne otopine, DMSO još je uvijek zlatni standard za kriopohranu KMS-a (29). Dimetil sulfoksid je po kemijskom sastavu [(CH₃)₂SO] amfipatska molekula, s jednom izrazito polarnom domenom i s dvije nepolarne domene, što omogućuje otapanje DMSO-a u vodenim i organskim otapalima, te je zbog navedenih svojstava vrlo pogodna otopina u laboratorijskom radu i kliničkoj primjeni (53).

Dimetil sulfoksid je bistra bezbojna tekućina koja kristalizira na + 18,5 °C, te je higroskopna i egzotermna kada se pomiješa s vodenim otopinama (54). Za pohranu KMS-a koristi se

kriozaštitna otopina koja uz DMSO sadrži i proteine (plazmu ili 5% otopinu albumina) te je završna koncentracija kriozaštitne otopine najčešće 5 do 10% (53).

Kada se kriozaštitna otopina dodaje pripravku stanica, molekule DMSO-a ulaze kroz staničnu membranu i povećavaju koncentraciju tvari unutar stanica, što sprječava gubitak vode iz stanice. Smanjuje se koncentracija elektrolita i stvaranje kristala leda jer se molekule DMSO-a vodikovim vezama vežu za molekule vode. Na taj način sprječava se dehidracija stanica i oštećenje stanica izazvano dehidracijom, a i održava se stabilna unutarstanična koncentracija soli i pH. Miješanje DMSO-a s vodom u pripravku stanica uzrokuje egzotermnu reakciju i dolazi do značajnog zagrijavanja otopine stanica, što može dovesti do gubitka stanica izloženih povišenoj temperaturi. Najčešći način ublažavanja toksičnosti povezane s izlaganjem DMSO-u je hlađenje pripravaka stanica i kriozaštitne otopine prije miješanja, te dodavanje otopine na temperaturi od 2 do 4° C.

Iako djeluje kriozaštitno, DMSO može djelovati i toksično na stanice utječući na enzimsku aktivnost, metabolizam stanica, stanični ciklus i diferencijaciju, ali i na apoptozu, bilo da ju inhibira ili potiče (53). Utjecaj DMSO-a ovisi o tipu, stupnju razvoja i fazi diferencijacije stanica, ali i o koncentraciji DMSO-a i vremenu izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini prije zamrzavanja i nakon odmrzavanja. Osim negativnog učinka na stanice, DMSO ima i negativan, toksičan učinak na bolesnike jer se tijekom infuzije često javljaju neželjene reakcije. Najčešći simptomi toksičnog učinka DMSO-a su malaksalost, mučnina, povraćanje, zimica i tresavica te tahikardija (55).

1.5.3. Zamrzavanje

Pripravke stanica potrebno je zamrzavati u kontroliranim uvjetima koristeći uređaj za zamrzavanje koji smanjuje temperaturu kontroliranom brzinom (engl. *controlled-rate freezer*). Zamrzavanje se može podijeliti u tri dijela: faza uravnoteženja (engl. *equilibration phase*), faza neprekinutoga i uravnoteženog hlađenja, te faza zamrzavanja do ciljne temperature.

U fazi uravnoteženja temperatura pripravka stanica ujednačuje se s temperaturom u komori za zamrzavanje prije samog procesa zamrzavanja. Ukoliko je vrijeme te faze prekratko postoji mogućnost negativnog utjecaja na preživljenje stanica nakon odmrzavanja.

Sljedeća faza je faza hlađenja u kojoj se stvaraju kristali leda u izvanstaničnoj tekućini što rezultira povišenjem osmotskog tlaka, te dolazi do izlaska molekula vode iz stanice osmozom, što za posljedicu ima dehidraciju stanica i povećanu koncentraciju otopljenih tvari (elektrolita) u unutarstaničnoj tekućini. Povećana koncentracija otopljenih tvari smanjuje

unutarstaničnu točku smrzavanja, te dolazi do smanjenja nastanka kristala leda unutar stanice (56). Ovaj proces je također egzotermna reakcija koja dovodi do povišenja temperature otopine, jer se otpušta latentna toplina pri prijelazu iz tekućeg u kruto stanje. Preporučena je kontrolirana brzina zamrzavanja od 1 do 2 °C po minuti, a neki protokoli imaju povećanu brzinu hlađenja u fazi oslobađanja topline, kako bi se neutralizirao njen štetan učinak na stanice (48). Važno je da faza hlađenja bude kontrolirana i uravnotežena, te da se prati krivulja zamrzavanja kako bi se mogao otkriti potencijalan pogrešan korak u postupku zamrzavanja ukoliko je vijabilnost stanica nakon odmrzavanja niža od očekivane.

Posljednja faza uključuje hlađenje stanica do ciljne temperature pohrane, koja sprječava značajno zagrijavanje pripravka kod prijenosa iz uređaja za zamrzavanje u spremnike za kriopohranu.

1.5.4. Pohrana

Preporučena temperatura pohrane pripravaka stanica je < -150 °C. Zamrznuti pripravci stanica pohranjuju se u spremnicima s tekućim dušikom (tekuća ili plinovita faza), koji moraju biti stalno nadzirani i imati mogućnost nadopunjavanja dušikom, jer u suprotnom ako dođe do promjene temperature tijekom pohrane, može doći do oštećenja stanica i u ovom dijelu kriopohrane. U spremnicima se, uz vrećice s pripravcima stanica, pohranjuju u istim uvjetima i pripadajući uzorci u krioampulama, uzeti za kontrolu kvalitete pripravaka stanica neposredno prije zamrzavanja.

1.5.5. Odmrzavanje

Postupak odmrzavanja kriopohranjenih stanica jednako je važan za preživljenje stanica kao i postupak kriopohrane. Pripravke stanica je potrebno odmrznuti u što kraćem vremenu od vađenja iz spremnika s dušikom, kako bi potencijalno oštećenje stanica nastalo odmrzavanjem bilo minimalno. Pripravci KMS-a odmrzavaju se neposredno prije transplantacije u vodenoj kupelji na 37 °C ili u uređajima za suho odmrzavanje na istoj temperaturi. Proces odmrzavanja ne bi trebao trajati više od nekoliko minuta, a odmrznuti pripravak KMS-a mora se infundirati u najkraćem mogućem vremenskom razdoblju, po mogućnosti u vremenu od 10 do 20 minuta od odmrzavanja, da se utjecaj DMSO-a na KMS, a i samog bolesnika, svede na najmanju moguću mjeru (48). Unatoč poznatim negativnim učincima DMSO-a na stanice i na bolesnika, njegovo uklanjanje se ne preporučuje zbog mogućnosti gubitka velikog broja KMS-a i njihovog dodatnog oštećenja tijekom pranja stanica, što za posljedicu može imati

dugotrajniji oporavak bolesnika nakon transplantacije ili pak neuspješnu transplantaciju KMS-a (57).

Odmrzavanje kontrolnih uzoraka u krioampulama također je potrebno provesti u što kraćem vremenu. Uvjeti odmrzavanja jednaki su onima za odmrzavanje kriopohranjenih pripravaka. Kontrolni uzorci odmrzavaju se nakon što su najmanje 72 sata bili kriopohranjeni, a prije nego što počne priprema bolesnika za transplantaciju.

1.6. Kontrola kvalitete pripravaka stanica

Kontrola kvalitete pripravaka stanica prikupljenih iz periferne krvi prema međunarodnim JACIE (*Joint Accreditation Committee of International Society of Cellular Therapy and the European Group for Blood and Marrow Transplantation*) standardima mora se provesti u 3 točke: u svježem pripravku, u kontrolnom uzorku kriopohranjenog pripravka u krioampuli (prije donošenja konačne odluke o prihvatljivosti pripravka za transplantaciju) te u uzorku odmrznutog pripravka uzetog iz vrećice neposredno prije transplantacije (51).

Budući da transport od mjesta odmrzavanja do laboratorija u nekim slučajevima može trajati više sati, potrebno je ispitati stabilnost odmrznutog uzorka tijekom transporta. No, prema dobroj laboratorijskoj praksi, a sukladno i akreditacijskoj normi za laboratorije EN ISO 15189, kao dio validacijskog protokola metoda koje se koriste u laboratoriju, potrebno je i ispitati stabilnost uzoraka za koje će se te metode koristiti (58). Ispitivanje stabilnosti značajno je za postavljanje protokola za upravljanje uzorcima u laboratorijskom radu, osobito za one vrste uzoraka koje su teško dobavljive, kao što su uzorci pripravaka KMS-a prikupljenih leukaferezom (59).

S druge strane, premda je preporuka odmrznuti pripravak stanica transplantirati u što kraćem vremenskom periodu od odmrzavanja, zbog nepredvidljivih okolnosti na koje se ne može utjecati (naglo pogoršanje stanja bolesnika ili medicinskog osoblja, kvar uređaja, potres, gubitak električne energije i sl.), ponekad odmrznute kriopohranjene pripravke stanica nije moguće transplantirati odmah. Kako je riječ o vrlo vrijednom i nanovo teško dobavljivom pripravku, nužno je znati unutar kojeg vremenskog razdoblja je takve stanice moguće koristiti, kako zbog sigurnosti tako i učinkovitosti takvih stanica za bolesnika.

1.6.1. Testovi za procjenu kvalitete pripravka

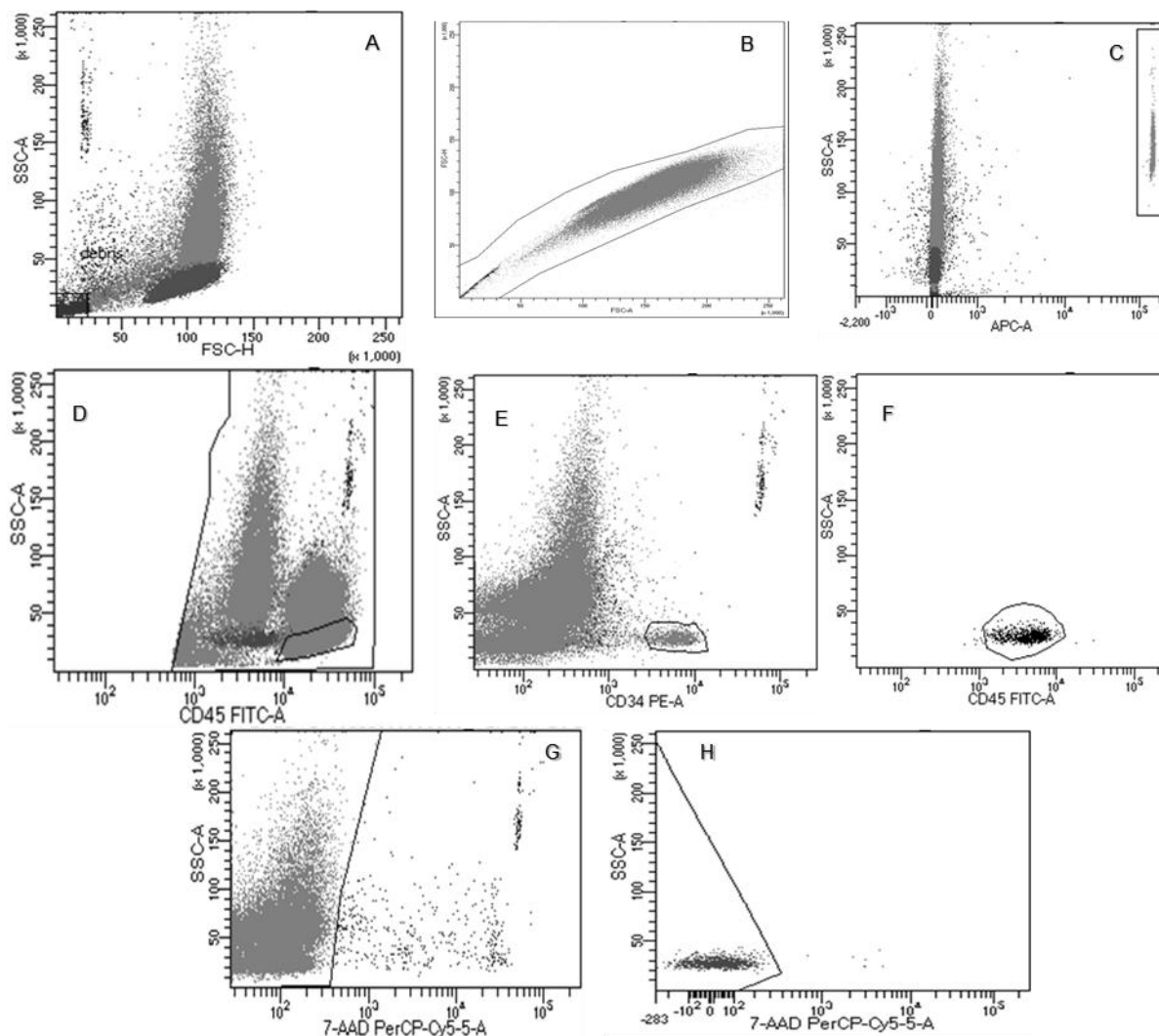
Za procjenu kvalitete pripravaka stanica zasada su na raspolaganju testovi za određivanje broja i vijabilnosti KMS-a i subpopulacija leukocita protočnom citometrijom, te funkcijski testovi.

Osnova protočne citometrije je određivanje stanica prema veličini i granuliranosti što omogućuje raspršenje svjetlosti u dva smjera: u smjeru upadne laserske zrake (engl. *forward scatter*, FSC), koji daje informacije o veličini stanice, te raspršenje pod kutom od 90° u odnosu na upadnu zraku (engl. *side scatter*, SSC), što ukazuje na granuliranost stanice. No, osim prema veličini i granuliranosti, stanice je moguće razlikovati vezanjem protutijela na specifične proteine odnosno antigene na ciljanim stanicama. Protutijela su obilježena fluorokromima, molekulama koje nakon pobuđivanja laserom emitiraju svjetlost različite

valne dulje od one kojom su bili pobuđene. Razvojem tehnologije omogućeno je da se u rutinskom radu koriste uređaji koji imaju 3 ili više lasera, a najčešći su plavi (488 nm), crveni (640 nm) i ljubičasti (405 nm) laser. Više lasera omogućuje istovremeno određivanje većeg broja ciljanih stanica u jednom koraku u odnosu na citometre koji imaju jedan ili dva lasera. No, osim broja lasera, broj detektora na protočnom citometru određuje broj protutijela odnosno različitih fluorokroma koje je u jednom koraku moguće koristiti za analizu ciljanih stanica.

1.6.1.1. Metode za određivanje krvotvornih matičnih stanica

Krvotvorne matične stanice određuju se analizom karakterističnog biljega, antigena CD34 protočnom citometrijom. U transplantacijskim centrima za određivanje KMS-a najčešće se primjenjuje protokol postavljen prema internacionalnim standardima (engl. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*, ISHAGE) (60). ISHAGE protokol detaljno opisuje KMS kao male i slabo granulirane stanice (nizak FSC i SSC), CD34 pozitivne stanice sa slabijim izražajem CD45 antigena (CD45^{dim}) koje moraju biti grupirane (engl. *cluster*) (Slika 4) (61, 62). CD45 je biljeg svih leukocita, a kako su KMS nezrele stanice na njima je on slabije izražen (dim).



Slika 4. Primjer protokola za određivanje CD34⁺ stanica; ISHAGE protokol (preuzeto i prilagođeno prema 62).

- A: točkasti prikaz FSC-H/SSC-A; B: točkasti prikaz FSC-H/FSC-a, engl. *singlets*; C: fluorescentne čestice za izračun apsolutnog broja stanica; D: CD45⁺ stanice; E i F: CD34⁺ i CD45^{dim} stanice - krvotvorne matične stanice; G i H: vijabilnost CD45⁺ i CD34⁺ stanica (7-AAD metoda).

FSC - prednje raspršenje (engl. *forward scatter*); SSC - bočno raspršenje (engl. *side scatter*); 7-AAD – 7 aminoaktinomicin D; FITC - fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*); PE – fikoeritrin (engl. *phycoerythrin*).

Sredinom devedesetih godina dvadesetog stoljeća ISHAGE protokol počeo se rutinski primjenjivati u transplantacijskoj medicini. Protokol je kroz godine nadograđivan dodavanjem boja i/ili biljega za određivanje vijabilnosti CD34+ stanica, i korištenjem fluorescentnih mikročestica (engl. *beads*) za izračun apsolutnog broja ciljanih stanica (61). Unatoč nadograđenom protokolu, u nekim laboratorijima se i danas određuje samo postotak CD34+ stanica protočnom citometrijom dok se apsolutni broj stanica izračunava množenjem koncentracije leukocita izmjerene na hematološkom brojaču s postotkom CD34+ stanica (engl. *dual-platform method*). Ukoliko se u laboratoriju primjenjuje ISHAGE protokol koji uključuje fluorescentne mikročestice za određivanje apsolutnog broja stanica, protočnom citometrijom se određuje i postotak i apsolutni broj CD34+ stanica (engl. *single-platform method*) (63).

Fluorescentne mikročestice za određivanje apsolutnog broja stanica mogu biti otopljene u puferiranoj otopini ili liofilizirane. Prednost upotrebe liofiliziranih mikročestica je u tome što se one nalaze u epruvetama za obilježavanje stanica u točno određenom broju, te se u epruvete dodaju protutijela i uzorci u kojima se određuje apsolutni broj ciljanih stanica. Kod mikročestica koje su u tekućem mediju, može doći do pogrešnog izračuna apsolutnog broja stanica bilo zbog dodavanja nedovoljnog volumena otopine mikročestica zbog nepravilnog pipetiranja ili pak zbog nepravilne homogenizacije otopine mikročestica.

U određenim vrstama uzoraka, kao što su periferna krv bolesnika, koštana srž ili krv iz pupkovine, koncentracija eritrocita ometa analizu stanica na protočnom citometru pa je stoga u takvim uzorcima potrebno lizirati eritrocite. U tu svrhu najčešće se primjenjuju dvije metode liziranja: metoda liziranja eritrocita i pranja stanica (engl. *lyse-wash method*) i metoda liziranja bez pranja stanica (engl. *lyse-no wash method*). Kod metode bez pranja stanica vrijeme pripreme uzorka za analizu je kraće i potencijalni gubitak stanica pranjem je minimalan za razliku od metode s pranjem stanica pri čemu može doći do gubitka stanica. Ukoliko laboratorij primjenjuje *single-platform* metodu s liofiliziranim mikročesticama primjenjuje se metoda bez pranja uzoraka.

1.6.1.2. Metode za određivanje subpopulacija leukocita

Primjenom monoklonskih protutijela na specifične biljege moguće je razlikovati pojedine subpopulacije leukocita. Za limfocite T karakterističan je biljeg CD3 koji se naziva i pan - limfocitni T biljeg. Za određivanje subpopulacija limfocita T koriste se biljezi CD4 za pomagačke limfocite T, koji su CD3+/CD4+ (engl. *helper T lymphocytes*) i CD8 za citotoksične limfocite T, CD3+/CD8+ (engl. *cytotoxic T lymphocytes*).

Za limfocite B karakterističan je biljeg CD19, bez izražaja CD3 biljega (CD3-/CD19+ stanice), dok su biljezi CD16 i CD56 karakteristični za NK stanice, koje također nemaju izražen biljeg CD3 (CD3-/CD16+/56+) (64). Monociti se mogu dokazati analizom biljega CD14.

Kao i u analizi KMS-a, za subpopulacije leukocita moguće je odrediti postotak i apsolutni broj pozitivnih stanica koristeći tzv. *single-platform* metodu, a ovisno o tome koja je vrsta uzorka za analizu, po potrebi se primjenjuje liziranje eritrocita.

1.6.1.3. Metode za određivanje vijabilnosti stanica protočnom citometrijom

Različite se metode koriste za određivanje vijabilnosti stanica u pripravcima KMS-a. Najstarija je metoda s tripanskim modrilom, bojom koja prolazi kroz staničnu membranu oštećenih stanica i na taj način omogućuje razdvajanje živih neobojenih stanica od nekrotičnih obojenih stanica. Broj živih stanica metodom s tripanskim modrilom određuje se brojanjem stanica pod svjetlosnim mikroskopom (65). Nedostatak metode je određivanje vijabilnost svih stanica s jezgrom, a ne određene populacije ciljanih stanica, tako da se metoda ne može koristiti za određivanje vijabilnosti KMS-a. Stoga se u procjeni kvalitete KMS-a vijabilnost stanica određuje najčešće metodom sa 7-amino-aktinomicinom D (7-AAD) na protočnom citometru. Metoda omogućuje razlikovanje populacije nekrotičnih stanica i onih u kasnoj apoptozi od populacije živih, vijabilnih stanica (66). Nakon što se ciljane stanice obilježe, 7-AAD ulazi u jezgru stanice i ugrađuje se između baza gvanin i citozin u deoksiribonukleinskoj kiselini, te se 7-AAD pozitivne stanice, koje su nekrotične i/ili u kasnoj apoptozi razlikuju od neobojanih stanica, odnosno 7-AAD negativnih koje su žive.

Iako se metoda sa 7-AAD-om najčešće koristi za laboratorijsku procjenu kvalitete KMS-a, postavlja se pitanje utječu li na kvalitetu pripravaka i stanice u ranoj apoptozi, odnosno imaju li takve stanice mogućnost proliferacije jednako kao i žive stanice.

Apoptozu karakteriziraju brojna morfološka oštećenja stanica, a jedno od najranijih je gubitak asimetričnosti plazmatske membrane, kojega karakterizira translokacija membranskog fosfatidilserina (FS) s unutarne na vanjsku stranu stanične membrane (67). Promjena količine

FS na vanjskoj strani membrane omogućila je razvoj testova za dokaz rane apoptoze a jedan od njih je test vezanja molekule aneksina V na FS.

Aneksin V je protein ovisan o kalciju koji ima afinitet za negativno nabijene lipide, odnosno fosfolipide, a osobito visok afinitet ima za FS (68). Stoga kada FS izađe na vanjsku stranu stanične membrane, što je slučaj već kod rane apoptoze, moguće je povezivanje aneksina V s FS (69). Kod određivanja vijabilnosti stanica, aneksin V se najčešće koristi u kombinaciji sa 7-ADD-om ili propidij jodidom (PI), te se na taj način razlikuju stanice u fazi rane apoptoze od onih u kasnoj apoptozi i/ili nekrozi. Stanice u ranoj apoptozi su aneksin V pozitivne/ 7-AAD (ili PI) negativne (engl. *single-positive stained cells*), dok u nekrotičnih stanica zbog povećane propusnosti stanične membrane 7-AAD ulazi u stanice, te su na protočnom citometru te stanice označene kao aneksin V pozitivne/7-AAD pozitivne (engl. *double-positive stained cells*) (68).

1.6.1.4. Test određivanja broja krvotvornih granulocitno-makrofagnih kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica

Najpouzdanija metoda određivanja funkcionalnosti, odnosno proliferacijske sposobnosti KMS-a je test određivanja broja krvotvornih granulocitno-makrofagnih kolonija u kratkotrajnoj kulturi stanica, CFU test (engl. *colony-forming unit*). Ovaj test mjeri kako se KMS dijele i stvaraju kolonije. Stanice se nasaduju pri niskoj koncentraciji te se nakon razdoblja rasta određuje broj nastalih kolonija (70). Nedostaci testa su nestandardiziranost, velika intra- i inter- laboratorijska varijabilnost, dostupnost izvedbe samo u specijaliziranim laboratorijima, neprikladnost u slučaju velikog broja uzoraka te vrijeme očitavanja i analize rezultata testa tek nakon nekoliko tjedana, najčešće za 14 dana (71, 72). Stoga je potrebno taj test zamijeniti prikladnijim, kako bi se brže procijenila kvaliteta transplantata i utvrdilo je li pripravak pogodan za transplantaciju.

Unatoč navedenim nedostacima CFU testa i dalje je dvojbeno jesu li spomenute metode određivanja stanica u ranoj apoptozi na protočnom citometru prikladna zamjena za CFU test i odražavaju li stvarno stanje stanica. Translokacija FS može biti odlika i procesa koji nisu povezani sa staničnom smrću, kao što je slučaj u aktivaciji limfocita T. Uz to, novija istraživanja pokazuju da su apoptoza i nekroza samo 2 ekstremna slučaja u cijelom spektru, kojeg zasad čini desetak poznatih načina na koji stanica može umirati (73).

Prema literaturnim podacima, samo u nekoliko istraživanja uspoređivani su rezultati određivanja vijabilnosti KMS-a koristeći promijenjeni ISHAGE protokol koji je uključivao određivanje živih CD34+ stanica kombiniranom metodom s aneksinom V i 7-AAD-om.

Dobiveni rezultati protočnom citometrijom ukazali su na dobru povezanost s rezultatima CFU testa (71,72). No ta su istraživanja provedena na uzorcima krvi iz pupkovine a ne na uzorcima pripravaka KMS-a iz periferne krvi.

1.7. Utjecaj kriopohrane na preživljenje stanica prikupljenih leukaferozom

Na preživljenje stanica nakon kriopohrane utječu različiti faktori koji su dosada najviše istraženi za autologne KMS, dok su nedovoljno istraženi za alogene KMS i ostale subpopulacije leukocita. Nezavisna istraživanja u kojima je ispitivan utjecaj kriopohrane na preživljenje stanica prikazuju oprečne rezultate: raspon preživljenja KMS-a odnosno preživljenja kolonija dobivenih CFU testom je između 40 i 70% (74-79). Bankova i sur. ispitivali su utjecaj kriopohrane na KMS i subpopulacije limfocita (limfociti T i B, NK stanice) u pripravcima stanica prikupljenim za alogenu transplantaciju. Analizom rezultata utvrđeno je značajno smanjenje postotka NK stanica, bez promjena u postotku limfocita T i B u kriopohranjenim pripravcima stanica prikupljenima za DLI u odnosu na postotke određenih subpopulacija u svježim pripravcima. No u istraživanju nije prikazano preživljenje stanica, već samo utjecaj kriopohrane na broj živih stanica određivan metodom s propidij jodidom (80). Rezultati istraživanja Panch i sur. upućuju na niži postotak preživljenja CD3+ stanica, iako ne statistički značajan, u pripravcima KMS-a prikupljenima za alogenu transplantaciju u odnosu na preživljenje CD3+ stanica u pripravcima prikupljenima za DLI (43).

No, važno je naglasiti kako vijabilnost i preživljenje CD34+ stanica i subpopulacija limfocita u navedenim istraživanjima nisu uključivala određivanje vijabilnosti s aneksinom V već metodama koje mogu odrediti samo nekrotične stanice i one u kasnoj apoptozi, kao što je 7-AAD ili PI.

Fisher i sur. u svom su istraživanju ispitivali preživljenje CD34+ i CD3+ stanica u kriopohranjenima odmrznutim alogenim pripravcima prikupljenima od srodnih i nesrodnih davatelja KMS-a. Broj živih CD3+ stanica u svježim pripravcima, broj živih CD34+ stanica u svježim i u odmrznutim kriopohranjenim pripravcima, te preživljenje CD34+ stanica, nisu se razlikovali između srodnih i nesrodnih davatelja. Nakon odmrzavanja, CD3+ stanice imale su niži postotak preživljenja u odnosu na CD34+ stanice, s nižim postotkom preživljenja CD3+ stanica kod nesrodnih davatelja (50). Iz rezultata istraživanja vidljiva je važnost određivanja vijabilnosti kriopohranjenih stanica nakon odmrzavanja, jer izravno utječu na preživljenje stanica, a to ima vrlo značajan utjecaj na oporavak bolesnika nakon transplantacije.

Berens i sur. ispitivali su učinak kriopohrane na preživljenje KMS-a i subpopulacija limfocita (limfocite T i limfocite B) i NK stanica u alogenim pripravcima KMS-a u mobiliziranih i

nemobiliziranih srodnih i nesrodnih davatelja KMS-a. Nakon odmrzavanja potvrđeno je da CD3+ stanice imaju niži postotak preživljenja u odnosu na CD34+ i CD19+ stanice, s tim da su CD19+ stanice imale veći postotak preživljenja u odnosu na CD34+ stanice. Nadalje, u pripravcima stanica prikupljenima od nesrodnih zdravih davatelja postotak preživljenja svih stanica bio je veći u odnosu na pripravke prikupljene od srodnih zdravih davatelja. Na NK stanice u ovom istraživanju procesi kriopohrane i odmrzavanja imali su najmanji utjecaj, odnosno NK stanice imale su najveći postotak preživljenja (81).

1.8. Kratkotrajna stabilnost odmrznutih kriopohranjenih stanica

Malobrojna istraživanja kratkotrajne stabilnosti odmrznutih pripravaka KMS-a provedena su na uzorcima krvi iz pupkovine i pripravcima KMS-a prikupljenih iz periferne krvi, a njihovi su rezultati oprečni (82-85). Tako rezultati istraživanja Huang i sur. upućuju na to da vijabilnost i funkcionalnost KMS-a značajnije opada već 20 minuta od odmrzavanja, dok Lee i sur. u zaključku svog istraživanja navode da neovisno o temperaturi pohrane nema značajnije promjene u vijabilnosti KMS-a unutar prvih 6 sati od odmrzavanja u uzorcima krvi iz pupkovine (83, 84).

U navedenim istraživanjima samo je određivana vijabilnost CD34+ stanica u svrhu procjene kratkotrajne stabilnosti uzoraka. No, kako je stanična terapija sve više zastupljena kao terapijska opcija, potrebno je poznavati vremenski period u kojem kriopohranjeni uzorak nakon odmrzavanja može biti pohranjen u kontroliranim uvjetima bez negativnog utjecaja na vijabilnost stanica. Prema nekim algoritmima maksimalno dopušteno vrijeme je 30 minuta, što znatno komplicira tijek rada i na mjestu proizvodnje pripravaka za staničnu terapiju, ali i na mjestu primjene pripravaka (39). Stoga je potrebno ispitati stabilnost odmrznutih kriopohranjenih stanica svih subpopulacija leukocita kako kod autoložnih tako i kod alogernih pripravaka u svrhu izrade algoritama stabilnosti uzoraka i primjene istih u rutinskom radu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME, HIPOTEZA i CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Iako je poznat utjecaj kriopohrane i odmrzavanja na preživljenje stanica autolognih pripravaka KMS-a prikupljenim iz periferne krvi leukaferozom, nepoznanica je utjecaj navedenih procesa na stanice alogenih pripravaka jer se oni najčešće transplantiraju svježi. No zbog COVID-19 pandemije javila se potreba za kriopohranom i alogenih pripravaka, te je uputno istražiti kako na vijabilnost i preživljenje stanica u toj vrsti pripravaka utječu kriopohrana i odmrzavanje. Osim pripravaka KMS-a, u novije vrijeme prikupljaju se i pripravci subpopulacija leukocita jer se iz njih proizvode pripravci za staničnu terapiju, što doprinosi napretku personalizirane medicine u bolesnika s malignim hematološkim bolestima, kao i u liječenju solidnih tumora, autoimunih i zaraznih bolesti. Stoga je potrebno istražiti kako kriopohrana i odmrzavanje utječu na preživljenje svih subpopulacija leukocita u autolognim i alogenim pripravcima prikupljenim iz periferne krvi postupkom leukaferoze, koji uključuju limfocite T i B, NK stanice i monocite, koji se koriste u proizvodnji imunoterapije temeljene na dendritičkim stanicama.

Kontrola kvalitete pripravka leukaferoze se prema međunarodnim JACIE standardima mora provesti u tri točke, od kojih je jedna kontrolni uzorak kriopohranjenog pripravka u krioepreveti prije donošenja konačne odluke o prihvatljivosti pripravka za transplantaciju. Budući da transport od mjesta odmrzavanja do laboratorija koji analizira vijabilnost stanica u nekim slučajevima može trajati više sati, potrebno je ispitati stabilnost odmrznutog uzorka tijekom transporta u kontroliranim uvjetima, na temperaturi od + 4 °C. Premda se odmrznuti pripravak treba transplantirati čim prije, ponekad zbog nepredvidljivih okolnosti, odmrznute stanice neće biti moguće odmah transplantirati. Za pretpostaviti je da dugotrajnije bivanje stanica u otopini s DMSO-om nakon odmrzavanja može imati nepovoljan učinak na njihovu vijabilnost i preživljenje. Kako je riječ o vrlo vrijednom i teško pribavljivom pripravku, nužno je znati unutar kojeg vremenskog razdoblja je takve stanice moguće koristiti i iz perspektive sigurnosti i učinkovitosti takvih stanica po bolesnika.

Budući da samo žive KMS imaju sposobnost proliferacije i oporavka hematopoeze nakon transplantacije, u kontroli kvalitete odmrznutog transplantata potrebno je odrediti broj živih KMS-a, kao i njihovu proliferacijsku sposobnost. Danas se za procjenu kvalitete u rutinskom radu najčešće koristi metoda određivanja vijabilnih stanica sa 7-AAD-om. No, nedostatak metode je određivanje stanica u kasnoj apoptozi i nekrozi, a ne i stanica u ranoj apoptozi za koje se također pretpostavlja da nemaju proliferacijsku sposobnost. Zbog poznatih nedostataka CFU testa koji služi za određivanje proliferacijske sposobnosti KMS-a, potrebno

je za procjenu kvalitete transplantata koristiti metodu koja je reproducibilnija, s manjim intra- i inter-individualnim varijacijama te čiji rezultati bi u kraćem vremenskom razdoblju dali uvid u proliferacijsku sposobnost KMS-a. Prema dosad objavljenim istraživanjima, za analizu preživljenja stanica može se koristiti kombinirana 7-AAD/ankesin V metoda kojom se dokazuju stanice i u ranoj apoptozi protočnom citometrijom, no dosadašnja istraživanja uključivala su uzorke krvi iz pupkovine.

Do sada nema objavljenih prospektivnih istraživanja u kojima su vijabilnost i preživljenje KMS-a i subpopulacija leukocita u pripravcima stanica prikupljenih leukaferozom određivani kombiniranom 7-AAD/ankesin V metodom.

Osim ispitivanja utjecaja procesa kriopohrane i odmrzavanja na preživljenje stanica, važno je ispitati u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka prikupljenih leukaferozom vremensko razdoblje od odmrzavanja koje je prihvatljivo za određivanje vijabilnost stanica u svrhu procjene kvalitete transplantata.

Svrha ovog istraživanja je pridonijeti razumijevanju utjecaja procesa kriopohrane i odmrzavanja na preživljenje i dinamiku razvitka procesa rane apoptoze i nekroze KMS-a i drugih subpopulacija leukocita u autolognim i alogenim pripravcima stanica prikupljenim iz periferne krvi postupkom leukaferoze, te istražiti ovisnost tih bioloških procesa o vremenu izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja. Rezultati istraživanja mogu potencijalno omogućiti uvođenje specifičnih analiza u rutinsku ocjenu kvalitete kriopohranjenih stanica, a time i izradu smjernica za postupanje s uzorcima nakon odmrzavanja u transplantacijskim centrima i znanstveno-istraživačkim laboratorijima. Na taj će način rezultati istraživanja značajno pridonijeti unaprjeđenju tehničke izvedivosti transplantacije KMS-a i proizvodnje pripravaka za staničnu terapiju.

Stoga je hipoteza ovog istraživanja da se KMS i stanice subpopulacija leukocita izolirane iz periferne krvi postupkom leukaferoze razlikuju po sposobnosti preživljenja nakon kriopohrane ovisno o vremenu izloženosti kriozaštitnoj otopini, pri čemu je određivanje živih ne apoptotičnih stanica s aneksinom V jednako pouzdan pokazatelj kvalitete KMS-a kao i određivanje njihovog klonogenog potencijala *in vitro*.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. U uzorcima autolognih i alogenih pripravaka stanica prikupljenih iz periferne krvi postupkom leukaferoze ispitati učinak kriopohrane i odmrzavanja na vijabilnost i preživljenje KMS-a i subpopulacija leukocita protočnom citometrijom.
2. U uzorcima autolognih i alogenih pripravaka stanica prikupljenih iz periferne krvi postupkom leukaferoze ispitati učinak kriopohrane i odmrzavanja na proliferacijsku sposobnost KMS-a CFU - GM testom u kratkotrajnoj kulturi stanica.
3. Ispitati kako na preživljenje odmrznutih kriopohranjenih stanica u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka utječe vrijeme izloženosti kriozaštitnoj otopini tijekom pohrane na + 4 °C u tri vremenske točke: odmah po odmrzavanja, sat vremena i tri sata nakon odmrzavanja kriopohranjenog uzorka.

3 . ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ovo prospektivno istraživanje provedeno je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) u razdoblju od svibnja 2021. do svibnja 2022. godine. U istraživanju je sudjelovalo 60 davatelja KMS-a iz periferne krvi obaju spolova u dobi od 18 do 65 godina s jednakim brojem zdravih srodnih i nesrodnih davatelja alogenih KMS-a i bolesnika planiranih za liječenje transplantacijom autolognim KMS. Krvotvorne matične stanice za autolognu transplantaciju prikupljane su u bolesnika s dijagnozom multiplog mijeloma i limfoma. Zdravi davatelji kojima su prikupljane KMS za alogenu transplantaciju morali su zadovoljiti kriterije koje je propisala svjetska organizacija *World Marrow Donor Association* (WMDA) za srodne i za nesrodne davatelje (86, 87). Isključni kriteriji za sudjelovanje u ovom istraživanju bili su aktivna infekcija uzročnicima krvlju prenosivih bolesti (hepatitis B i C, HIV 1/2) i mikrobiološko onečišćenje pripravaka.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb (klasa: 8.1-21/116-2; broj: 02/21 JG) te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 643-02/21-03/01; ur. broj: 251-62-03-21-27). Svi davatelji KMS-a koji su sudjelovali u ovom istraživanju su uz suglasnost za prikupljanje i kriopohranu stanica potpisali i suglasnost za sudjelovanje u ovom istraživanju koje je bilo provedeno u skladu sa svim važećim smjernicama, kojima je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u istraživanju sukladno Helsinškoj deklaraciji, Zakonu o zaštiti prava pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04, 37/08) te Uredbi (EU) 2016/679 Europskog parlamenta i vijeća.

3.1.1. Izračun snage studije

Prije istraživanja provedena je analiza snage studije (engl. *power analysis*). Uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$, srednju veličinu učinka $d = 0,5$ i 44 ispitanika, snaga Studentovog t-testa za zavisne uzorke iznosila je 90 %. Analiza snage testa za ANOVA test za ponovljena mjerenja pokazala je da uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$, srednju veličinu učinka $f = 0,25$ i 44 ispitanika, snaga testa iznosi 95 %. U analizi Pearsonovog koeficijenta korelacije u 44 ispitanika, razinu značajnosti $\alpha = 0,05$, veličinu učinka $\rho = 0,4$ snaga testa bila je > 80 %.

Minimalna veličina uzorka povećana je za oko 10 % radi postizanja jednakih vrijednosti snage testa u slučaju korištenja neparametrijskih testova i bila je procijenjena na ukupno 48 ispitanika.

3.2. Metode

3.2.1. Mobilizacija krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži u perifernu krv

U bolesnika koji su bili planirani za prikupljanje stanica za autolognu transplantaciju, nakon primjene kemoterapije specifične za dijagnozu, KMS su bile mobilizirane iz koštane srži u perifernu krv primjenom G-CSF-a, od kojih je filgrastim (Accofill, Accord Healthcare S.L.U., Barcelona, Španjolska) primilo najviše sudionika ovog istraživanja (28/30 bolesnika), a pegfilgrastim (Amgen Technology, Dublin, Irska) i lipegfilgrastim (Lonquex, Teva Pharmaceuticals Europe B.V., Amsterdam, Nizozemska) primio je po jedan sudionik. Bolesnici u kojih nije bilo očekivanog porasta broja CD34+ stanica u perifernoj krvi dodatno su primili i pleriksafor (Mozobil, Genzyme Corporation, Cambridge, Velika Britanija). Svim zdravim davateljima KMS su mobilizirane u perifernu krv primjenom filgrastima u dozi od 10 mg/kg tjelesne težine tijekom 5 dana.

3.2.2. Prikupljanje stanica postupkom leukaferoze

Nakon primjene mobilizacijske terapije praćena je koncentracija leukocita u perifernoj krvi bolesnika i kad je bila viša od $1 \times 10^9/L$, započelo je određivanje koncentracije CD34+ stanica u perifernoj krvi u svrhu procjene početka prikupljanja autoloških KMS-a. Postupak leukaferoze započet je kada je koncentracija CD34+ stanica u perifernoj krvi bolesnika bila najmanje $10 \times 10^6/L$. U svih zdravih davatelja prikupljanje stanica počelo je peti dan od početka primjene filgrastima.

U KBC Zagreb pripravci stanica prikupljeni su staničnim separatorom Spectra Optia, programom za kontinuirano prikupljanje mononuklearnih stanica (CMNC), verzija 11 (Terumo BCT, Lakewood, SAD) postupkom leukaferoze velikog volumena krvi (31). Kako bi se spriječilo zgrušavanje krvi za vrijeme leukaferoze, infundirana je antikoagulantna otopina citrata ACD-A (engl. *acid citrat dextrose*) kojoj je dodano 6 internacionalnih jedinica heparina/mL ACD-A, a omjer antikoagulantne otopine i pune krvi bio je 1:24.

3.2.3. Kriopohrana pripravaka stanica

Prikupljene stanice zamrznute su u uređaju za kontrolirano zamrzavanje uz dodatak kriozaštitne otopine pripremljene miješanjem 20 % DMSO-a (CryoSure DMSO, WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Njemačka), i 80 % otopine 5 % albumina (Albunorm 50 g/L, Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H., Beč, Austrija). Kriozaštitna otopina dodavala se automatski vrlo polako brzinom od 5 mL/min u vrećicu s pripremkom stanica koristeći uređaj Smart-Max (Biosafe SA, Eysins, Švicarska) ili ručno, ovisno o volumenu svježeg pripravka i broju vrećica za zamrzavanje.

Nakon dodavanja kriozaštitne otopine iz svake vrećice izdvojen je jedan mL alikvota pripravka u krioampulu. Takav uzorak stanica reprezentativan je uzorak kriopohranjenog pripravka i služi za rutinsku procjenu kvalitete pripravaka nakon kriopohrane. Za potrebe ovog istraživanja izdvojen je jedan dodatan alikvot (1 mL) pripravka stanica.

Vrećice i alikvoti zamrzavani su u istim uvjetima rabeći aparat za kontrolirano zamrzavanje Cryo 560-16 (Planer Concentrate Ltd., Sunbryon-Thames, Velika Britanija). Uvjeti zamrzavanja ispisuju se na krivulji zamrzavanja, koja daje detaljan uvid u temperature tijekom vremena u postupku zamrzavanja.

Pripravci stanica bili su pohranjeni u vrećice CryoMACS Freezing Bag (Miltenyi Biotec Inc., Arburn, SAD) koje imaju dodatnu zaštitnu vrećicu kako bi se spriječilo križno onečišćenje pripravaka tijekom pohrane u tekućem dušiku.

Odmah nakon završetka postupka zamrzavanja pripravci stanica premješteni su u spremnik s plinovitom fazom tekućeg dušika; tu su pohranjeni do završne kontrole pripravaka koja uključuje rezultate mikrobioloških testiranja i rezultate testova kratkotrajne kulture stanica. Ukoliko su zadovoljeni svi kriteriji završne kontrole, kriopohranjeni pripravci bili su premješteni u spremnike s tekućim dušikom (Consarctic, model BSF350MPG, Consarctic GmbH, Westerngrund, Njemačka), pohranjeni na temperaturi $< - 140$ °C do postupka transplantacije.

3.2.4. Odmrzavanje i postupanje s uzorkom pripravka stanica nakon odmrzavanja

Kako bi se procijenila kvaliteta kriopohranjenih stanica, u vodenoj kupelji (Wather bath-thermostat WB-4MS, BioSan, Riga, Latvija) na 37 °C odmrznuti su kriopohranjeni uzorci pripravaka. Postupak odmrzavanja trajao je 1 – 3 minute uz neprestano miješanje uzoraka, do trenutka kada su u krioampuli još bili komadići kristala leda, koji su se do obilježavanja stanica u potpunosti otopili.

Nakon odmrzavanja kriopohranjenih uzoraka, a prije pripreme za analizu na protočnom citometru, nije uklonjena kriozaštitna otopina niti je uzorak razrijeđen.

3.2.5. Određivanja parametara kompletne krvne slike

Parametri kompletne krvne slike u uzorcima svježih pripravaka KMS-a kao i koncentracija leukocita u odmrznutim kriopohranjenim uzorcima određeni su na hematološkom analizatoru Advia 2120i (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

3.2.6. Imunofenotipizacija stanica

Na protočnom citometru BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, SAD) određeni su postotak i apsolutni broj živih CD34+ stanica te postotak i apsolutni broj živih stanica subpopulacija leukocita (limfocita T i B, NK stanica i monocita) u svježim i odmrznutim kriopohranjenim uzorcima pripravaka stanica prikupljenih postupkom leukaferoze. Analiza svih populacija stanica uključenih u ovo istraživanje provedena je koristeći program za analizu BD FACS DIVA (verzija 8.0.1.; BD Biosciences, San Jose, SAD).

U istraživanju je za analizu stanica korištena metoda za određivanje postotka i apsolutnog broja stanica u jednom koraku, tzv. *single platform* metoda. U tu svrhu kod obilježavanja stanica rabljene su epruvete koja sadrže unaprijed određen broj fluorescentnih mikročestica koje služe za određivanje apsolutnog broja ciljanih stanica (Trucount tubes, BD Biosciences, San Jose, SAD).

Reagensi koji su se koristili za obilježavanje stanica u svježim uzorcima bili su sobne temperature (minimalno 15 minuta prije upotrebe, protutijela i ostali potrebni reagensi bili su na sobnoj temperaturi kako bi se stabilizirali), dok su reagensi koji su rabljeni za obilježavanje stanica u odmrznutim kriopohranjenim uzorcima bili pohranjeni na + 4 °C do trenutka obilježavanja stanica. Svi reagensi bili su od istog proizvođača (BD Biosciences, San Jose, SAD). Svi uzorci pripravaka stanica prikupljeni iz periferne krvi postupkom leukaferoze (svježi i odmrznuti kriopohranjeni uzorci) imali su nizak hematokrit (< 3 %), odnosno vrlo

nisku koncentraciju eritrocita, pa u protokolima za obilježavanje stanica i pripreme uzoraka za analizu nije bilo liziranja eritrocita.

3.2.6.1. Određivanje krvotvornih matičnih stanica

Postotak i apsolutni broj KMS-a određen je prema promijenjenom ISHAGE protokolu, a stanice su obilježene monoklonskim protutijelima CD45-FITC (klon 2D1) i anti-CD34-PE (klon 8G12) u jednakom omjeru (63, 88).

3.2.6.2. Određivanje subpopulacija leukocita

Za određivanje CD45+ stanica u protokolu za određivanje subpopulacija leukocita rabljeno je monoklonsko protutijelo CD45-BV 510 (klon HI30). Monoklonska protutijela CD3-APC (klon SK7), CD4-PE (klon SK3) i CD8-FITC (klon SK1) rabljena su za obilježavanje limfocita T, CD19-APC (klon SJ25C1) za limfocite B, te koktel protutijela za NK stanice (BD Simultest™ CD3/CD16+CD56) koji sadrži CD3-FITC (klon SK7) te CD56-PE (klon MY31) i CD16-PE (klon B73.1). Za monocite su bila korištena protutijela CD45-FITC (klon 2D1) i CD14-PE (klon MΦP9).

3.2.6.3. Određivanje vijabilnosti stanica

Vijabilnost stanica određena je kombiniranom metodom sa 7-AAD-om (BD Pharmingen™ 7-AAD) i aneksinom V (BD Horizon™ BV421 Annexin V), koja omogućuje određivanje nekrotičnih stanica i stanica u kasnoj apoptozi (7-AAD pozitivne/aneksin V pozitivne stanice), te stanice u ranoj apoptozi (7-AAD negativne/aneksin V pozitivne stanice) (72). Kako aneksin V za svoju aktivnost treba kalcijeve ione, u protokolu obilježavanja stanica korištena je i puferirana otopina koja sadrži kalcijeve ione, odnosno pufer za vezanje aneksina V (BD Pharmingen™ 10x Annexin V Binding buffer).

3.2.6.4. Postupak obilježavanja stanica

3.2.6.4.1. Obilježavanje krvotvornih matičnih stanica

U epruvetu s fluorescentnim mikročesticama dodano je 10µL CD45-FITC, 10µL CD34-PE, 20 µL 7-AAD, 10 µL Annexin V BV421 i 13 µL 10x Annexin V Binding buffer. Nakon toga, u epruvetu je dodan razrijeđeni uzorak pripravka, ovisno o koncentraciji leukocita u uzorku (Tablica 1), te su obilježene stanice inkubirane u mraku 20 minuta: svježi uzorci na sobnoj temperaturi, a odmrznuti kriopohranjeni uzorci u hladnjaku na + 4 °C. Odmah nakon

inkubacije dodan je jedan mL fiziološke otopine puferirane fosfatima (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) te je uzorak propušten na protočnom citometru.

Korišteno je razrjeđenje stanica, kako bi se omogućio odgovarajući prolazak stanica kroz protočnicu (< 500 stanica po sekundi), što je dobiveno verifikacijom metode za određivanje CD34+ stanica (21).

Sve subpopulacije stanica u uzorcima u ovom istraživanju bile su obilježene i analizirane u duplikatu. Po uzorku je ispitano 100 000 CD45+ stanica.

Tablica 1. Prikaz razrjeđenja uzoraka za analizu stanica

Koncentracija leukocita ($\times 10^9/L$)	Količina uzorka (μL)	Količina PBS-a (μL)
< 40	100	0
40 – 80	50	50
81 – 140	20	80
> 140	10	90

3.2.6.4.2. Obilježavanje subpopulacija leukocita

Protokol za određivanje subpopulacija leukocita podijeljen je na tri dijela:

1) određivanje limfocita B i NK stanica

2) određivanje limfocita T

3) određivanje monocita.

1) Obilježavanje limfocita B i NK stanica

U epruvetu s fluorescentnim mikročesticama dodano je 5 μ L CD45-BV510, 5 μ L CD19-APC, 10 μ L koktela CD3/CD16+CD56, 20 μ L 7-AAD, 10 μ L Annexin V BV421 i 13 μ L10x Annexin V Binding buffer, te razrijeđeni uzorak, ovisno o broju leukocita (Tablica 1).

2) Obilježavanje limfocita T

U epruvetu s fluorescentnim mikročesticama dodano je 5 μ L CD45-BV510, 5 μ L CD3-APC, 5 μ L CD8-FITC, 5 μ L CD4-PE, 20 μ L 7-AAD, 10 μ L Annexin V BV421 i 13 μ L10x Annexin V Binding buffer, te razrijeđeni uzorak, ovisno o broju leukocita (Tablica 1).

3) Obilježavanje monocita

U epruvetu s fluorescentnim mikročesticama dodano je 5 μ L CD45-FITC, 5 μ L CD14-PE, 20 μ L 7-AAD, 10 μ L Annexin V BV421 i 13 μ L10x Annexin V Binding buffer te razrijeđeni uzorak, ovisno o broju leukocita (Tablica 1).

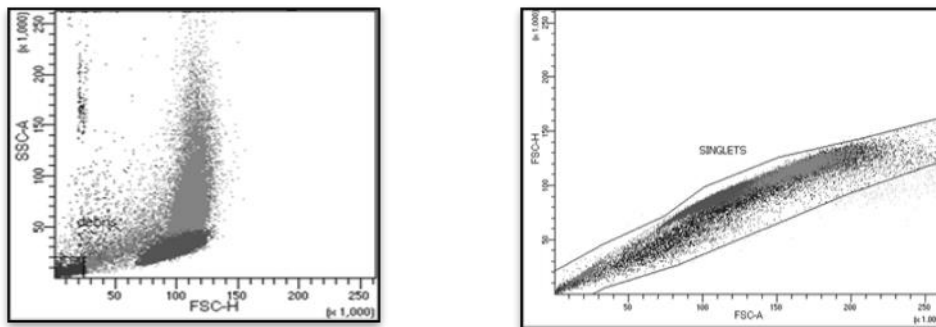
Inkubacija stanica te daljnji postupak s uzorkom bio je isti kao u točki 3.2.6.4.1.

3.2.6.5. Analiza uzoraka na protočnom citometru

Prije propuštanja (engl. *acquisition*) i analize uzoraka napravljena je provjera lasera i detektora na protočnom citometru koristeći standardizirane fluorescentne mikročestice BD FACS Diva CS&T IVD beads (BD Biosciences) prema uputama proizvođača. Prije analize uzoraka uključenih u ovo istraživanje obilježeni su i analizirani kontrolni uzorci od proizvođača reagensa u svrhu provjere metode i protokola za analizu stanica. Za KMS korišten je *BD Stem cell control kit* koji sadrži dva kontrolna uzorka, jedan s niskim, drugi s visokim postotkom i apsolutnim brojem CD34+ stanica. Za limfocite je korišten *BD Multy Check control kit* (BD Biosciences) koji sadrži jedan kontrolni uzorak, a ciljne vrijednosti dostupne su za sve subpopulacija leukocita uključene u ovo istraživanje. Kontrolni uzorci

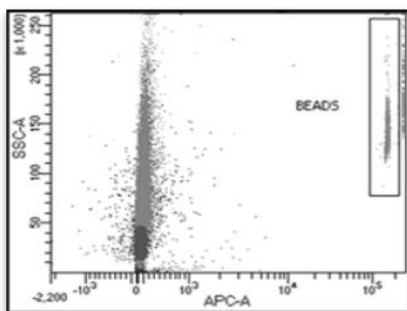
obilježeni su jednako kao i uzorci u istraživanju, te su analizirani na istim protokolima, kako bi se provjerila točnost metode.

Uzorci su propuštani i analizirani u programu BD FACS DIVA, verzija 8.0.1. (BD Biosciences). U svim protokolima temeljem prednjeg (FCS) i bočnog raspršenja (SSC) iz analize su isključeni dijelovi raspadnutih stanica (engl. *debris*) i nakupine stanica, te su u analizu uključene samo stanice koje su jedna po jedna prošle kroz protočnicu u protočnom citometru (engl. *singlets*) (Slika 5).



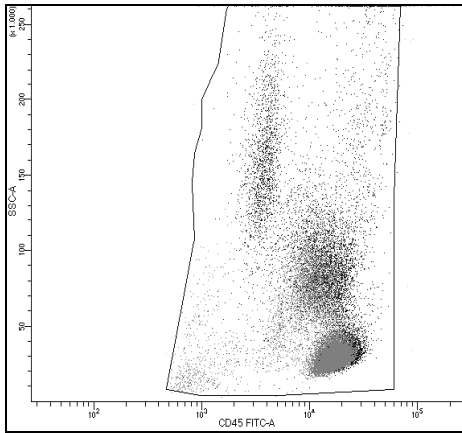
Slika 5. Prikaz prednjeg (eng. *forward scatter*, FSC) i bočnog raspršenja (eng. *side scatter*, SSC): A) dijelovi raspadnutih stanica, B) stanice koje su pojedinačno prošle kroz protočnicu.

Iz analize su izdvojene i fluorescentne mikročestice (engl. *beads*) koje služe za izračun apsolutnog broja stanica (Slika 6).



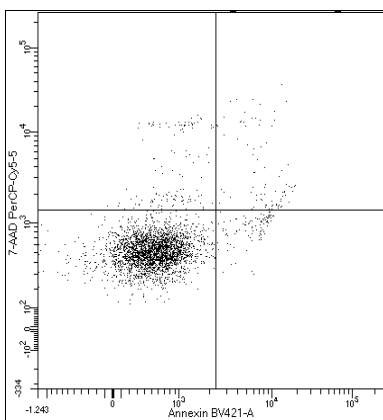
Slika 6. Prikaz prednjeg bočnog raspršenja (eng. *side scatter*, SSC) s prikazom fluorescentnih čestica.

Sljedeći korak u svim protokolima bio je odraditi CD45⁺ stanice (Slika 7).



Slika 7. Prikaz CD45+ stanica u protokolima za određivanje svih subpopulacija leukocita.

Krvotvorne matične stanice analizirane su prema ISHAGE protokolu (Slika 4). U analizi stanica subpopulacija leukocita prvo su bile označene CD45+ stanice u protokolu (Slika 7), a nakon toga biljeg-pozitivne stanice: CD3+ limfociti T, uz subpopulacije CD4+ i CD8+, CD19+/CD3- limfociti B, CD56+/CD16+/CD3- NK stanice, te CD14+ monociti. Posljednji korak u analizi bilo je određivanje vijabilnosti stanica kombiniranom 7-AAD/ankesin V metodom (Slika 8).



Slika 8. Točkasti prikaz (engl. *dot-plot*) stanica primjenom kombinirane 7-AAD/ankesin V metode.

3.2.7. Test kratkotrajne kulture stanica

Testom kratkotrajnog uzgoja stanica određen je broj stanica koje *in vitro* stvaraju kolonije granulocita i makrofaga (engl. *colony-forming unit-granulocyte-macrophage*, CFU-GM) u uzorcima svježeg pripravka leukaferoze i u odmrznutim kriopohranjenim uzorcima pripravaka KMS-a. Stanice su bile zasađene u koncentraciji 1×10^5 stanica s jezgrom/mL u polučvrsti medij koristeći komercijalni pripravak MethoCult H4034 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada), nakon čega su stavljene u inkubator HERAcell 240i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) te inkubirane u kontroliranim uvjetima pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂. Kolonije su izbrojane nakon 14 dana na analizatoru StemVision (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada), a rezultati izraženi brojem kolonija na 1×10^5 zasađenih stanica s jezgrom (70).

3.2.8. Izračun ukupnog broja živih stanica u pripravcima leukaferoze

Ukupan broj živih stanica u pripravcima leukaferoze izračunat je množenjem apsolutnog broja živih stanica određenog protočnom citometrijom s volumenom pripravka pripravka leukaferoze.

3.2.9. Izračun preživljenja stanica nakon kriopohrane

Za sve subpopulacije leukocita te za kolonije dobivene CFU testom izračunato je preživljenje stanica (%) nakon odmrzavanja (81).

Za svaku ispitivanu populaciju stanica na protočnom citometru preživljenje je izračunato prema formuli:

$$\frac{\text{Apsolutni broj živih stanica u odmrznutom kriopohranjenom uzorku} \times \text{volumen kriopohranjenog pripravka}}{\text{Apsolutni broj živih stanica u svježem uzorku} \times \text{volumen svježeg pripravka leukaferoze}} \times 100$$

Za kolonije dobivene testom kratkotrajne kulture stanica preživljenje je izračunato prema formuli:

$$\frac{\text{Broj kolonija u odmrznutom kriopohranjenom uzorku} \times \text{volumen kriopohranjenog pripravka}}{\text{Broj kolonija u svježem uzorku} \times \text{volumen svježeg pripravka leukaferoze}} \times 100$$

3.2.10. Ispitivanje stabilnosti odmrznutih kriopohranjenih uzoraka

Određivanje stabilnosti uključivalo je određivanje postotka i apsolutnog broja živih KMS-a, limfocita T i B, NK stanica i monocita u tri vremenske točke: odmah po odmrzavanju, te sat vremena i tri sata nakon odmrzavanja.

Odmah nakon odmrzavanja, iz krioampule je uzet dio uzorka te su stanice obilježene prema prethodno navedenim protokolima (točka 3.2.6.4.1. i 3.2.6.4.2) i analizirane su na protočnom citometru (točka 3.2.6.5.). Ostatak uzorka pohranjen je u hladnjaku na + 4 °C, do sljedeće dvije točke uzorkovanja, sat vremena i 3 sata nakon odmrzavanja, kada su stanice ponovno obilježene i analizirane na protočnom citometru.

3.2.11. Statistička obrada podataka

Svi podaci povezani s ispitanicima ovog istraživanja, kao i rezultati analiza obrađeni su u programu Microsoft Excel Office 2010. Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog programa MedCalc, verzija 19.5.2 (MedCalc, Ostend, Belgija). Kvantitativni podaci prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom (engl. *interquartile range*, IQR) dok je dob ispitanika prikazana medijanom i rasponom od minimuma do maksimuma.

Normalnost raspodjele kvantitativnih podataka ispitana je Shapiro-Wilksovim testom. Razlika u vrijednosti brojčanih varijabli između dvije točke mjerenja analizirana je parnim t-testom za zavisne uzorke za rezultate koji prate normalnu distribuciju vrijednosti, odnosno Wilcoxonovim testom sume razlika za rezultate koji ne prate normalnu distribuciju vrijednosti. Za nezavisne uzorke, razlike u distribuciji vrijednosti brojčanih varijabli analizirane su Mann-Whitney testom za rezultate koji ne prate normalnu distribuciju vrijednosti, odnosno Studentovim t-testom za rezultate koji prate normalnu distribuciju vrijednosti.

Povezanost između dvije numeričke varijable analizirana je Spearmanov koeficijentom korelacije (Rs). Rezultati korelacijskih koeficijenata tumačeni su na sljedeći način:

- Odsutnost korelacije: vrijednosti $0 < r < 0,25$ ili $-0,25 < r < 0$
 - slaba povezanost varijabli: vrijednosti $0,25 < r < 0,50$ ili $-0,50 < r < -0,25$
 - umjerena do dobra povezanost varijabli: vrijednosti $0,50 < r < 0,75$ ili $-0,75 < r < -0,50$
 - vrlo dobra ili odlična povezanost varijabli: vrijednosti $0,75 < r < 1$ ili $-1 < r < -0,75$
- (89).

Stabilnost odmrznutih uzoraka ispitana je određivanjem postotka i apsolutnog broja živih stanica u tri vremenske točke: odmah nakon odmrzavanja, te sat vremena i tri sata od odmrzavanja. Statistička značajnost promjene vrijednosti pokazatelja tijekom ispitivanja stabilnosti između tri točke mjerenja ispitana je analizom varijance za ponavljana mjerenja. Kada je u analizi varijance za ponavljana mjerenja bio nađen statistički značajan F omjer, *post hoc* testovima analizirana je razlika između točaka mjerenja.

Prilikom svih usporedbi razina statističke značajnosti postavljena je na $P = 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Obilježja davatelja krvotvornih matičnih stanica

U istraživanju su sudjelovali davatelji KMS-a prikupljenih iz periferne krvi postupkom leukafereze. Trideset bolesnika prikupljalo je stanice za autolognu transplantaciju dok su zdravi davatelji (N = 30) prikupljali KMS za potrebe alogene transplantacije. Obilježja davatelja i mobilizacijski protokoli prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Obilježja davatelja autolognih i alogenih pripravaka krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi.

Davatelji autolognih krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi		
Spol	Muškarci	14
	Žene	16
Dob (godine), medijan (raspon)	57 (27 – 65)	
Dijagnoze	Multipli mijelom	21
	Ne-Hodgkinov limfom	8
	Hodgkinov limfom	1
Mobilizacijski protokol	Kemoterapija + G-CSF	21
	G-CSF	1
	Kemoterapija + G-CSF + Mozobil	4
	G-CSF + Mozobil	4
Davatelji alogenih krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi		
Spol	Muškarci	21
	Žene	9
Dob (godine), medijan (raspon)	32 (21 - 59)	
Vrsta davatelja	Srodni	7
	Nesrodni	23
Mobilizacijski protokol	Faktori rasta (G-CSF)	30

G-CSF - čimbenik rasta granulocitnih kolonija (engl. *granulocyte colony stimulating factor*)

4.2. Obilježja svježih autolognih i alogenih stanica prikupljenih leukaferozom

U Tablici 3 prikazana su obilježja svježih autolognih pripravaka KMS-a. Analizom stanica protočnom citometrijom u sedam pripravaka (šest pripravaka bolesnika s ne-Hodgkinovim limfomom, NHL i jednog s multiplim mijelomom) nisu pronađeni limfociti B (CD3-/CD19+ stanice), dok u pripravku jednog bolesnika s NHL-om nisu pronađene niti NK stanice (CD3-/CD16+/56+ stanice). Obilježja svježih alogenih pripravaka KMS-a prikazani su u Tablici 4.

Vrijeme od završetka prikupljanja stanica do kriopohrane za autologne pripravke iznosilo je 4,5 sati (medijan; IQR 4 – 5 sati), dok je za alogene pripravke medijan bio 27 sati (IQR 4 -48 sata).

U KBC-u Zagreb bili su prikupljeni svi autologni pripravci KMS-a (N = 30) te 10 od 30 alogenih pripravaka. Dvadeset i tri autologna pripravaka, kao i svi alogeni pripravci koji su prikupljeni u KBC-u Zagreb (N = 10) bili su kriopohranjeni unutar pet sati od završetka postupka leukaferoze, dok je sedam autolognih i 20 alogenih pripravaka bilo pohranjeno preko noći u kontroliranim uvjetima na + 4 °C, te kriopohranjeno maksimalno do 54 sata od završetka prikupljanja stanica.

Tablica 3. Obilježja svježih autolognih pripravaka prikupljenih leukaferozom.

	Mjerna jedinica	Medijan	Interkvartilni raspon
Leukociti	10 ⁹ /L	124,5	90,1 – 163,0
Hematokrit	%	2,5	1,4 – 3,4
Trombociti	10 ⁹ /L	912	624 – 1190
Žive CD45+ /7AAD- stanice	%	99,0	99,0 – 100
Granulociti	%	26,3	18,8 – 39,9
Volumen svježih pripravaka leukaferoze	mL	299,1	290,4 – 340,3
CD34+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	746	464 – 1149
	%	99,4	98,5 – 99,8
CD19+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	644	1267 – 3621
	%	99,9	99,6 – 100,0
CD14+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	35618	21426 – 44164
	%	99,9	99,8 – 100
CD16+/CD56+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	1654	549 – 3679
	%	99,7	99,4 – 99,8
CD3+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	29177	21716 – 51547
	%	99,8	99,6 – 99,9
CD3+/CD8+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	8810	5170 – 19533
	%	99,8	99,7 – 99,9
CD3+/CD4+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	18311	10963 – 33199
	%	99,9	99,7 – 99,9

7-AAD – 7-amino aktinomycin D; mL – mililitar; L- litra

Tablica 4. Obilježja svježih alogenih pripravaka prikupljenih leukaferozom.

	Mjerna jedinica	Medijan	Interkvartilni raspon
Leukociti	10 ⁹ /L	161,5	137,0 – 188,0
Hematokrit	%	2,2	1,9 – 2,5
Trombociti	10 ⁹ /L	1477	1240 – 1848
CD45+/7-AAD- stanice	%	99,0	96,0 – 100,0
Granulociti	%	23,5	17,8 – 32,7
Volumen svježih pripravaka leukaferoze	mL	104,0	69,0 – 124,0
CD34+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	1221	948 – 2341
	%	99,3	98,3 – 99,7
CD19+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	11933	9399 – 15487
	%	99,8	99,7 – 99,9
CD14+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	40300	28927 – 48692
	%	99,9	99,7 – 99,9
CD16+/CD56+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	5155	3653 – 6980
	%	99,7	99,3 – 99,8
CD3+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	45215	37968 – 64978
	%	99,5	96,4 – 99,7
CD3+/CD8+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	15475	10720 – 19644
	%	99,6	97,6 – 99,8
CD3+/CD4+/7-AAD- stanice	10 ⁶ /L	31525	24956 – 39429
	%	99,5	96,5 – 99,8

7-AAD - 7-amino aktinomicin D; mL – mililitar; L- litra

4.3. Usporedba rezultata vijabilnosti stanica nakon kriopohrane dobivenih određivanjem standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom te usporedba postotka preživljenja stanica kod autolognih pripravaka

U uzorcima svježih autolognih pripravaka KMS-a, medijani vijabilnosti za KMS i sve subpopulacije leukocita bili su $\geq 99,5$ % kada je vijabilnosti stanica određivana 7-AAD metodom, a $\geq 99,4$ % kada je određivana kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom.

U odmrznutim kriopohranjenim uzorcima medijani vijabilnosti bili su $\geq 94,2$ % za 7-AAD metodu, odnosno $\geq 92,5$ % za 7-AAD/aneksin V metodu.

Statističkom analizom podataka dokazana je značajna razlika za postotke živih stanica određivanima dvama metodama za vijabilnost, i u svježim i odmrznutim kriopohranjenim uzorcima autolognih pripravaka KMS-a (Tablica 5).

U svježim i odmrznutim kriopohranjenim uzorcima autolognih pripravaka KMS-a ukupan broj živih KMS-a i svih subpopulacija leukocita određen standardnom 7-AAD metodom statistički je bio značajno viši od ukupnog broj živih stanica određenog kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba postotaka i ukupnog broj živih stanica u autolognim pripravcima dobivenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom

	Stanice	Žive stanice, 7-AAD negativne (%)	Žive stanice, 7-AAD negativne/ aneksin V negativne (%)	P	Žive stanice, 7-AAD negativne (x10 ⁶)	Žive stanice, 7-AAD negativne/ aneksin V negativne (x10 ⁶)	p
Syježi uzorci	CD34	99,4 (98,5 – 99,8)	98,8 (97,5 – 99,3)	<0,001	221 (146 – 408)	221 (144 – 408)	<0,001
	CD19	99,9 (99,6 – 100,0)	99,2 (98,6 – 99,8)	<0,001	201 (6 – 411)	201 (6 – 408)	<0,001
	CD14	99,9 (99,8 – 100)	98,7 (96,4 – 99,7)	<0,001	9982 (6929 – 12934)	9948 (6523 – 12932)	<0,001
	CD16/ CD56	99,7 (99,4 – 99,8)	99,4 (99,1 – 99,7)	<0,001	523 (211 - 1104)	519 (211 – 1107)	0,001
	CD3	99,8 (99,6 – 99,9)	99,5 (99,1 – 99,7)	<0,001	8493 (5633 – 16229)	8454 (6473 – 16097)	<0,001
	CD3/CD8	99,8 (99,7 – 99,9)	99,5 (99,2 – 99,7)	<0,001	2835 (1548 – 6820)	2806 (1539 – 6787)	<0,001
	CD3/CD4	99,9 (99,7 – 99,9)	99,5 (99,0 – 99,7)	<0,001	5272 (3189 – 10034)	5259 (3189 – 10031)	<0,001
Odmrznuti kriofranjeni uzorci	CD34	94,9 (91,4 – 96,8)	93,1 (90,2 – 95,3)	<0,001	153 (118 – 271)	149 (113 – 263)	<0,001
	CD19	94,2 (87,8 – 97,5)	92,5 (87,3 – 97,0)	<0,001	174 (7 – 417)	173 (7 – 417)	<0,001
	CD14	95,3 (91,7 – 96,4)	93,6 (89,9 – 95,3)	<0,001	7486 (6362 – 10182)	7407 (6161 – 9492)	<0,001
	CD16/ CD56	94,9 (92,1 – 96,6)	94,1 (90,7 – 95,9)	<0,001	465 (253 – 964)	455 (253 – 958)	<0,001
	CD3	98,1 (98,2 – 99,4)	97,1 (94,9 – 98,2)	<0,001	9061 (5209 – 15475)	8958 (5204 – 15429)	<0,001
	CD3/CD8	98,8 (98,2 – 99,4)	98,1 (97,6 – 98,6)	<0,001	3044 (1464 – 8361)	3027 (1360 – 8251)	<0,001
	CD3/CD4	98,6 (94,8 – 99,1)	97,0 (93,6 – 98,0)	<0,001	4657 (3520 – 10253)	4626 (3511 – 10227)	<0,001

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)

7-AAD – 7-amino aktinomycin D

Analizom rezultata nađena je statistički značajna razlika u postocima preživljenja stanica u uzorcima autolognih pripravaka nakon kriopohrane koji su dobiveni dvama metodama za određivanje vijabilnosti: CD34+stanice (P < 0,001), CD19+ stanice (P = 0,037), CD14+ stanice (P < 0,001) i CD16+/CD56+ stanice (P = 0,002) (Tablica 6). Rezultati dobiveni 7-AAD metodom bili su viši u odnosu na rezultate dobivene kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom.

Tablica 6. Usporedba preživljenja stanica u odmrznutim kriopohranjenim autolognim pripravcima leukaferenze

Stanice	Preživljenje stanica (%) 7-AAD metoda	Preživljenje stanica (%) 7-AAD/aneksin V metoda	P
CD34	73,7 (64,8 – 80,9)	72,7 (63,3 – 79,6)	<0,001*
CD19	100,1 (88,6 – 109,8)	100,3 (88,5 – 109,2)	0,037**
CD14	81,1 (67,2 – 93,7)	78,4 (63,8 – 89,8)	<0,001**
CD16/ CD56	92,2 (77,9 – 109,0)	92,0 (76,2 – 106,3)	0,002**
CD3	104,1 (91,3 – 113,5)	103,7 (90,0 – 112,3)	0,078
CD3/CD8	109,2 (98,6 – 122,1)	109,0 (99,1 – 122,5)	0,467
CD3/CD4	101,4 (90,0 – 110,4)	102,4 (90,6 – 110,0)	0,809

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)

7-AAD – 7-amino aktinomicin D

4.4. Usporedba rezultata vijabilnosti stanica nakon kriopohrane dobivenih određivanjem standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom te usporedba postotka preživljenja stanica kod alogenih pripravaka

U svježim uzorcima alogenih pripravaka KMS-a medijani vijabilnosti za KMS i subpopulacije leukocita bili su $\geq 99,3$ % kada je vijabilnosti stanica određivana 7-AAD metodom, odnosno $\geq 98,6$ % kada je određivana kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom.

U odmrznutim kriopohranjenim uzorcima medijani vijabilnosti bili su $\geq 93,9$ % za 7-AAD metodu, odnosno $\geq 92,1$ % za 7-AAD/aneksin V metodu.

Statističkom analizom dokazana je značajna razlika u postocima živih stanica određivanima dvama metodama za vijabilnost, bilo da se radi o uzorcima svježih ili odmrznutih kriopohranjenih alogenih pripravaka KMS-a (Tablica 7).

U svježim i odmrznutim kriopohranjenim uzorcima alogenih pripravaka ukupan broj živih KMS-a i subpopulacija leukocita statistički se značajno razlikovao kada su uspoređivani rezultati dobiveni dvama metodama za vijabilnost, osim kod određivanja ukupnog broja živih CD16⁺/56⁺ stanica u uzorcima svježih pripravaka ($P = 0,126$) (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba postotaka i ukupnog broja živih stanica u alogenim pripravcima dobivenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom

	Stanice	Žive stanice, 7-AAD negativne (%)	Žive stanice, 7-AAD negativne/ aneksin V negativne (%)	P	Žive stanice, 7-AAD negativne (x10 ⁶)	Žive stanice, 7-AAD negativne/ aneksin V negativne (x10 ⁶)	p
Svježi uzorci	CD34	99,3 (98,3 – 99,7)	98,6 (97,9 – 99,4)	<0,001**	142 (111 – 188)	142 (110 – 187)	0,006*
	CD19	99,8 (99,7 – 99,9)	99,3 (99,0 – 99,6)	<0,001*	1152 (952 – 1532)	1149 (952 – 1531)	0,004*
	CD14	99,9 (99,7 – 99,9)	99,2 (98,1 – 99,4)	<0,001**	3805 (3032 – 4808)	3772 (2933 – 4808)	<0,001*
	CD16/CD56	99,7 (99,3 – 99,8)	99,3 (98,6 – 99,8)	<0,001**	481 (364 – 699)	467 (364 – 632)	0,126
	CD3	99,5 (96,4 – 99,7)	98,9 (96,2 – 99,5)	<0,001**	4962 (3778 - 5893)	4946 (3768-5831)	0,037*
	CD3/CD8	99,6 (97,6 – 99,8)	99,2 (97,4 – 99,5)	<0,001**	1475 (1158 – 2042)	1471 (1157 – 2036)	0,021*
	CD3/CD4	99,5 (96,5 – 99,8)	99,1 (96,5 – 99,6)	<0,001**	2960 (2503 – 3928)	2944 (2503 – 3901)	0,011*
Odmrznuti kriophranjeni uzorci	CD34	94,5 (91,7 – 95,7)	92,1 (87,9 – 94,6)	<0,001**	108 (78 – 128)	107 (76 – 124)	<0,001*
	CD19	99,1 (98,2 – 99,3)	98,1 (97,5 – 98,6)	<0,001**	1253 (1002 – 1555)	1241 (998 – 1542)	<0,001*
	CD14	93,9 (91,8 – 95,3)	93,0 (91,3 – 94,6)	<0,001*	2908 (2234 – 3483)	2884 (2207 – 3457)	<0,001*
	CD16/CD56	94,9 (89,9 – 96,8)	92,1 (88,2 – 95,3)	<0,001**	456 (285 – 632)	449 (283 – 626)	<0,001*
	CD3	95,7 (92,1 – 97,6)	94,8 (91,7 – 97,0)	<0,001**	4648 (3419 - 6163)	4628 (3413 – 6149)	0,005**
	CD3/CD8	97,1 (95,1 – 98,6)	96,8 (94,4 – 98,4)	<0,001**	1551 (1122 – 1942)	1532 (1118 – 1937)	<0,001**
	CD3/CD4	94,3 (90,1 – 96,5)	94,1 (90,0 – 96,4)	<0,001*	2904 (1995 – 3752)	2887 (1986– 3738)	<0,001**

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)

7-AAD – 7-amino aktinomicin D

Postoci preživljenja CD34+ stanica (P = 0,002) i CD16+/CD56+ stanica (P = 0,002) statistički su se značajno razlikovali kada je vijabilnost stanica određivana dvijema metodama za vijabilnost. Za ostale subpopulacije leukocita nije nađena statistički značajna razlika (Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba preživljenja stanica u odmrznutim kriopohranjenim alogenim pripravcima leukaferenze

	Preživljenje stanica (%) 7-AAD metoda	Preživljenje stanica (%) 7-AAD/aneksin V metoda	P
CD34	68,4 (63,3 – 74,4)	68,1 (59,5 – 74,6)	0,002**
CD19	108,6 (95,7 – 114,7)	107,9 (96,1 – 113,5)	0,148
CD14	73,3 (59,8 – 90,2)	74,5 (59,4 – 90,2)	0,112
CD16/ CD56	97,3 (86,6 – 108,2)	96,0 (85,6 – 105,7)	0,001*
CD3	94,3 (85,7 – 103,1)	93,5 (85,5 – 105,2)	0,430
CD3/CD8	97,1 (86,2 – 108,2)	99,1 (87,4 – 107,8)	0,884
CD3/CD4	91,9 (84,0 – 104,9)	91,8 (82,4 – 105,0)	0,165

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)

7-AAD – 7-amino aktinomicin D.

4.5. Povezanosti preživljenja KMS-a i subpopulacija leukocita s obilježjima autolognih pripravaka stanica

Kod autolognih pripravaka nađena je slaba negativna povezanost između koncentracije trombocita u svježim pripravcima leukaferoze i postotka preživljenja CD3⁺ stanica kada je za određivanje vijabilnosti rabljena 7-AAD metoda (P = 0,042, Rs = - 0,374) te za postotak preživljenja CD3⁺CD4⁺ stanica kada su žive stanice određivane kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom (P = 0,043, Rs = - 0,372) (Tablica 9).

Analizom rezultata dobivena je i slaba negativna povezanost između vremenskog razdoblja pohrane svježeg pripravka prije kriopohrane i postotka preživljenja CD3⁺/CD8⁺ stanica (7-AAD metoda: P = 0,028, Rs = -0,401; 7-AAD/aneksin V metoda: (P = 0,028, Rs = -0,401) (Tablica 9).

Tablica 9. Povezanosti preživljenja stanica nakon kriopohrane s obilježjima autoložnih pripravaka KMS-a

		Svježi uzorci										Odmrznuti uzorci		Vrijeme pohrane svježeg pripravka (sati)	
		CD45+ stanice (x10 ⁹ /L)		Žive CD45+/7AAD-stanice (%)		Hematokrit (%)		Granulociti (%)		Trombociti (x10 ⁹ /L)		CD45+ stanice (x10 ⁹ /L)			
Stanice	Metoda	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P
CD34+	7AAD	-0,075	0,693	0,192	0,310	-0,109	0,565	-0,052	0,785	-0,199	0,291	0,318	0,087	0,061	0,725
	7-AAD /Ann V	-0,130	0,495	0,131	0,491	-0,136	0,475	-0,061	0,748	-0,229	0,224	0,319	0,086	0,059	0,758
CD19+	7AAD	-0,247	0,256	-0,289	0,181	-0,063	0,774	-0,168	0,445	0,051	0,816	-0,087	0,695	-0,084	0,705
	7-AAD /Ann V	-0,299	0,166	-0,234	0,283	-0,097	0,660	-0,232	0,287	0,037	0,867	-0,139	0,526	-0,045	0,839
CD16+/ CD56+	7AAD	-0,114	0,563	-0,138	0,484	0,168	0,393	0,035	0,860	-0,038	0,849	0,010	0,961	0,036	0,857
	7-AAD /Ann V	-0,067	0,736	-0,168	0,392	0,141	0,476	-0,018	0,927	-0,059	0,767	0,023	0,907	0,009	0,963
CD3+	7AAD	0,303	0,103	-0,174	0,357	0,060	0,754	0,051	0,791	-0,374	0,042	0,337	0,068	-0,307	0,094
	7-AAD /Ann V	0,299	0,108	-0,165	0,382	0,062	0,745	0,022	0,910	-0,355	0,054	0,358	0,052	-0,308	0,097
CD3+/ CD8+	7AAD	0,260	0,165	0,052	0,784	0,066	0,731	0,101	0,594	-0,338	0,067	0,357	0,053	-0,401	0,028
	7-AAD /Ann V	0,252	0,179	0	1,000	0,032	0,868	0,069	0,719	-0,352	0,056	0,338	0,068	-0,401	0,028
CD3+/ CD4+	7AAD	0,213	0,258	-0,035	0,855	0,033	0,862	-0,144	0,447	-0,359	0,051	0,354	0,055	-0,094	0,623
	7-AAD /Ann V	0,127	0,503	-0,139	0,463	0,048	0,803	0,001	0,994	-0,372	0,043	0,261	0,164	-0,265	0,158
CD14+	7AAD	0,121	0,523	-0,157	0,408	-0,047	0,805	-0,204	0,280	-0,198	0,295	0,222	0,239	-0,129	0,496
	7-AAD /Ann V	0,147	0,439	-0,157	0,408	-0,044	0,817	-0,198	0,294	-0,232	0,217	0,270	0,149	-0,104	0,584

statistički značajna razlika dobivena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rs); P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)

7-AAD: 7-aminoaktinomycin D; Ann V: aneksin V

4.6. Povezanost preživljenja KMS-a i subpopulacija leukocita s obilježjima alogenih pripravaka stanica

Analizom povezanosti preživljenja stanica s obilježjima alogenih pripravaka KMS-a dobivena je vrlo dobra negativna povezanost između postotka granulocita u svježem pripravku i preživljenja CD3+ stanica ($P < 0,001$, $R_s = - 0,759$ za 7-AAD metodu, $P < 0,001$, $R_s = - 0,768$ za 7-AAD/aneksin V metodu), odnosno dobra negativna povezanost za CD3+/CD8+ stanice ($P = 0,001$, $R_s = - 0,668$ za 7-AAD metodu, $P = 0,001$, $R_s = - 0,666$ za 7-AAD/aneksin V metodu) i CD3+/CD4+ stanice ($P < 0,001$, $R_s = - 0,718$ za 7-AAD metodu i $P < 0,001$, $R_s = - 0,720$, za 7-AAD/aneksin V metodu) (Tablica 10).

Povezanost obilježja pripravaka leukaferenze s preživljenjem ostalih subpopulacija leukocita kod alogenih pripravaka u ovom istraživanju nije dokazana.

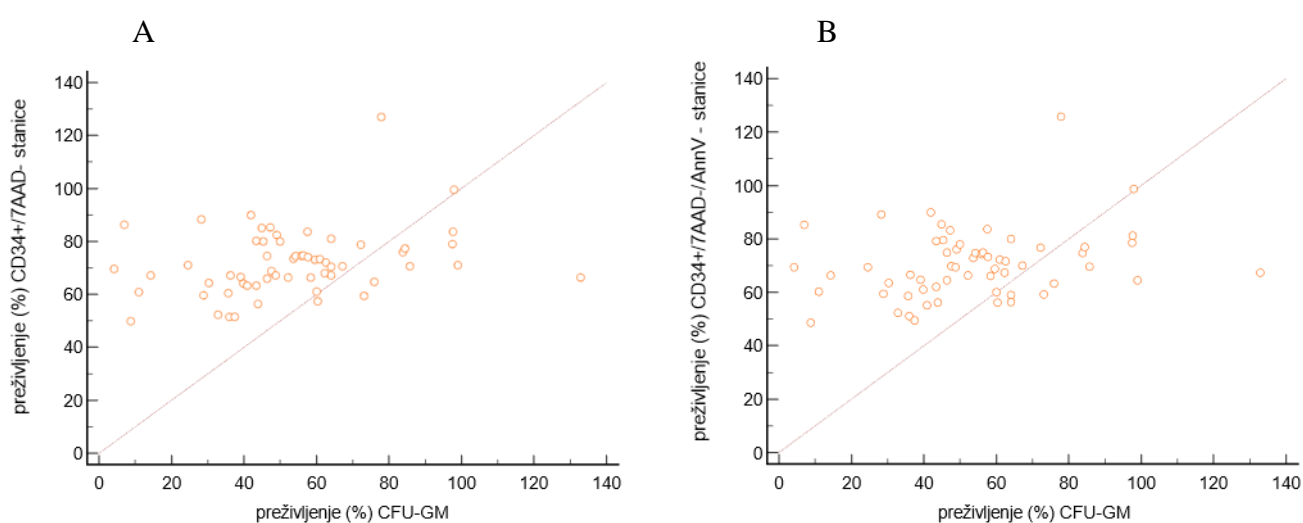
Tablica 10. Povezanosti preživljenja stanica nakon kriopohrane s obilježjima alogenih pripravaka KMS-a

		Svježi uzorci										Odmrznuti uzorci		Vrijeme pohrane svježeg pripravka (sati)	
		CD45+ stanice (x10 ⁹ /L)		Žive CD45+/7-AAD-stanice (%)		Hematokrit (%)		Granulociti (%)		Trombociti (x10 ⁹ /L)		CD45+ stanice (x10 ⁹ /L)			
Stanice	Metoda	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P	Rs	P
CD34+	7-AAD	-0,183	0,334	-0,262	0,163	-0,114	0,551	-0,221	0,263	-0,036	0,852	0,152	0,422	0,085	0,656
	7-AAD /Ann V	-0,160	0,397	-0,286	0,126	-0,087	0,648	-0,237	0,207	0,065	0,734	0,195	0,302	0,120	0,527
CD19+	7-AAD	-0,156	0,409	0,022	0,910	-0,222	0,238	-0,292	0,118	0,237	0,207	-0,042	0,824	0,110	0,561
	7-AAD /Ann V	-0,169	0,372	-0,013	0,944	-0,203	0,282	-0,318	0,087	0,237	0,207	-0,027	0,890	0,118	0,536
CD16+/ CD56+	7-AAD	-0,115	0,546	0,024	0,901	-0,235	0,212	-0,129	0,499	0,076	0,690	0,154	0,417	0,078	0,683
	7-AAD /Ann V	-0,095	0,618	-0,008	0,968	-0,236	0,208	-0,111	0,559	0,091	0,634	0,173	0,360	0,129	0,496
CD3+	7-AAD	-0,078	0,683	0,299	0,109	-0,080	0,675	-0,759	<0,001	0,247	0,187	-0,186	0,325	-0,299	0,109
	7-AAD /Ann V	-0,040	0,834	0,302	0,105	-0,051	0,790	-0,768	<0,001	0,232	0,217	-0,192	0,309	-0,307	0,098
CD3+/ CD8+	7-AAD	-0,108	0,569	0,156	0,412	-0,049	0,798	-0,668	0,001	0,203	0,283	-0,083	0,664	-0,236	0,209
	7-AAD /Ann V	-0,099	0,602	0,153	0,421	-0,034	0,866	-0,666	0,001	0,213	0,259	-0,096	0,614	-0,236	0,209
CD3+/ CD4+	7-AAD	-0,097	0,612	0,311	0,094	-0,108	0,569	-0,718	<0,001	0,248	0,187	-0,224	0,195	-0,295	0,113
	7-AAD /Ann V	-0,096	0,616	0,303	0,101	-0,093	0,625	-0,720	<0,001	0,252	0,180	0,254	0,175	-0,294	0,115
CD14+	7-AAD	-0,165	0,384	-0,334	0,071	0,159	0,402	-0,109	0,565	-0,027	0,889	0,330	0,075	0,132	0,485
	7-AAD /Ann V	-0,163	0,390	-0,318	0,087	0,161	0,394	-0,099	0,603	-0,024	0,899	0,335	0,071	0,122	0,522

statistički značajna razlika dobivena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rs); P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**)
7-AAD: 7-aminoaktinomycin D; Ann V: aneksin V

4.7. Povezanost postotka preživljenja CD34+ stanica s postotkom preživljenja kolonija u testu kratkotrajne kulture stanica (CFU test) u uzorcima autolognih i alogernih pripravaka stanica

Medijan preživljenja CFU-GM kolonija u uzorcima pripravaka KMS-a bio je 51 % (IQR 39,5 – 64,0 %). Analizom rezultata nađena je slaba povezanost postotka preživljenja CD34+ stanica s postotkom preživljenja kolonija dobivenih CFU testom s obje metode za određivanje vijabilnosti CD34+ stanica (7-AAD metoda $P = 0,021$, koeficijent korelacije 0,298; kombinirana 7-AAD/aneksin V metoda $P = 0,043$, koeficijent korelacije 0,262) (Slika 9).



Slika 9. Prikaz povezanosti postotka preživljenja CD34+ stanica s postotkom preživljenja CFU-GM kolonija u testu kratkotrajne kulture stanica u uzorcima pripravaka KMS-a: A - preživljenje CD34+ stanica za koje su žive stanice određene 7-AAD metodom ($P = 0,021$, $R_s = 0,298$); B preživljenje CD34+ stanica za koje su žive stanice određene kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom ($P = 0,043$, $R_s = 0,262$).

4.8. Rezultati ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih i alogenih pripravaka stanica

Utjecaj vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini u kriopohranjenim uzorcima nakon odmrzavanja (N = 60) ispitan je određivanjem apsolutnog broja živih stanica te postotka živih stanica koristeći dvije metode za određivanje vijabilnost.

Analizom apsolutnog broja (Slika 10) i postotka (Slika 11) živih stanica 7-AAD i 7-AAD/aneksin V metodom dobivena je statistički značajna razlika između sve tri vremenske točke mjerenja za CD34+, CD14+ i CD19+ stanice ($P < 0,001$).

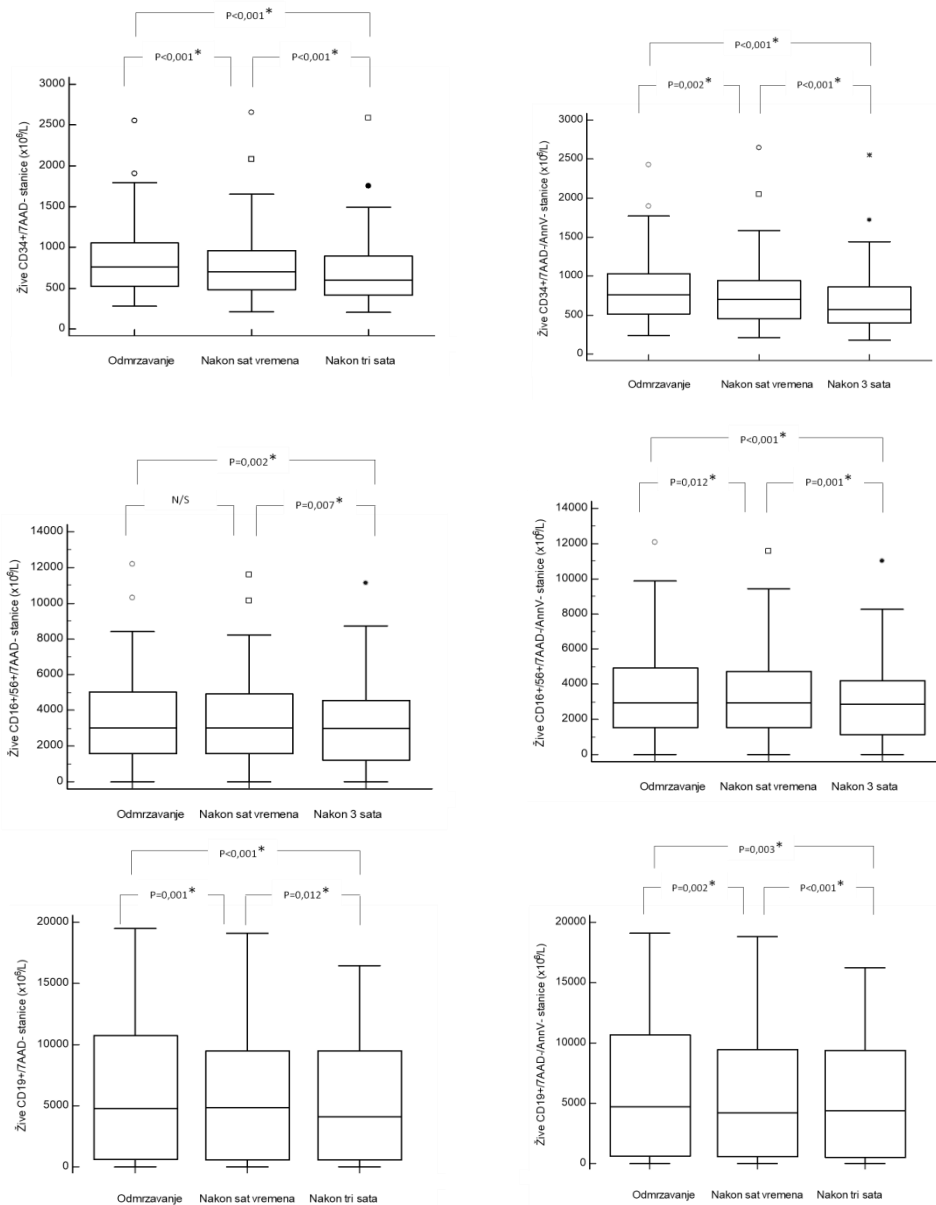
Za apsolutni broj živih CD16+/CD56+ stanica 7-AAD metodom dobivena je statistički značajna razlika između rezultata dobivenih tri sata nakon odmrzavanja u odnosu na rezultate odmah nakon odmrzavanja i sat vremena nakon odmrzavanja ($P = 0,005$) (Slika 10).

Kod subpopulacija limfocita T statistički značajna razlika dobivena je između rezultata mjerenja odmah nakon odmrzavanja i rezultata tri sata nakon odmrzavanja za apsolutni broj živih CD3+ stanica (7-AAD metoda $P = 0,012$; 7-AAD/aneksin V metoda $P = 0,003$) (Slika 10). No, kod usporedbe rezultata postotka živih CD3+ stanica dobivena je statistički značajna razlika između rezultata mjerenih sat vremena i tri sata nakon odmrzavanja 7-AAD metodom ($P = 0,016$), a kada je vijabilnost stanica određena kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom statistički su se značajno razlikovali rezultati dobiveni tri sata nakon odmrzavanja u odnosu na rezultate odmah po odmrzavanju i sat vremena nakon odmrzavanja ($P < 0,001$) (Slika 11).

Za apsolutni broj živih CD3+/CD8+ stanica utvrđena je statistički značajna razlika između rezultata izmjerenih odmah nakon odmrzavanja uzorka i rezultata izmjerenih sat vremena i tri sata od odmrzavanja bez obzira kojom metodom je određivana vijabilnosti stanica (7-AAD metoda $P < 0,001$; 7-AAD/aneksin V metoda $P < 0,001$) (Slika 10). Za postotke živih stanica dobivena je statistički značajna razlika između rezultata mjerenja tri sata nakon odmrzavanja u odnosu na rezultate za ostale dvije vremenske točke mjerenja (7-AAD metoda $P < 0,001$; 7-AAD/aneksin V metoda $P < 0,001$) (Slika 11).

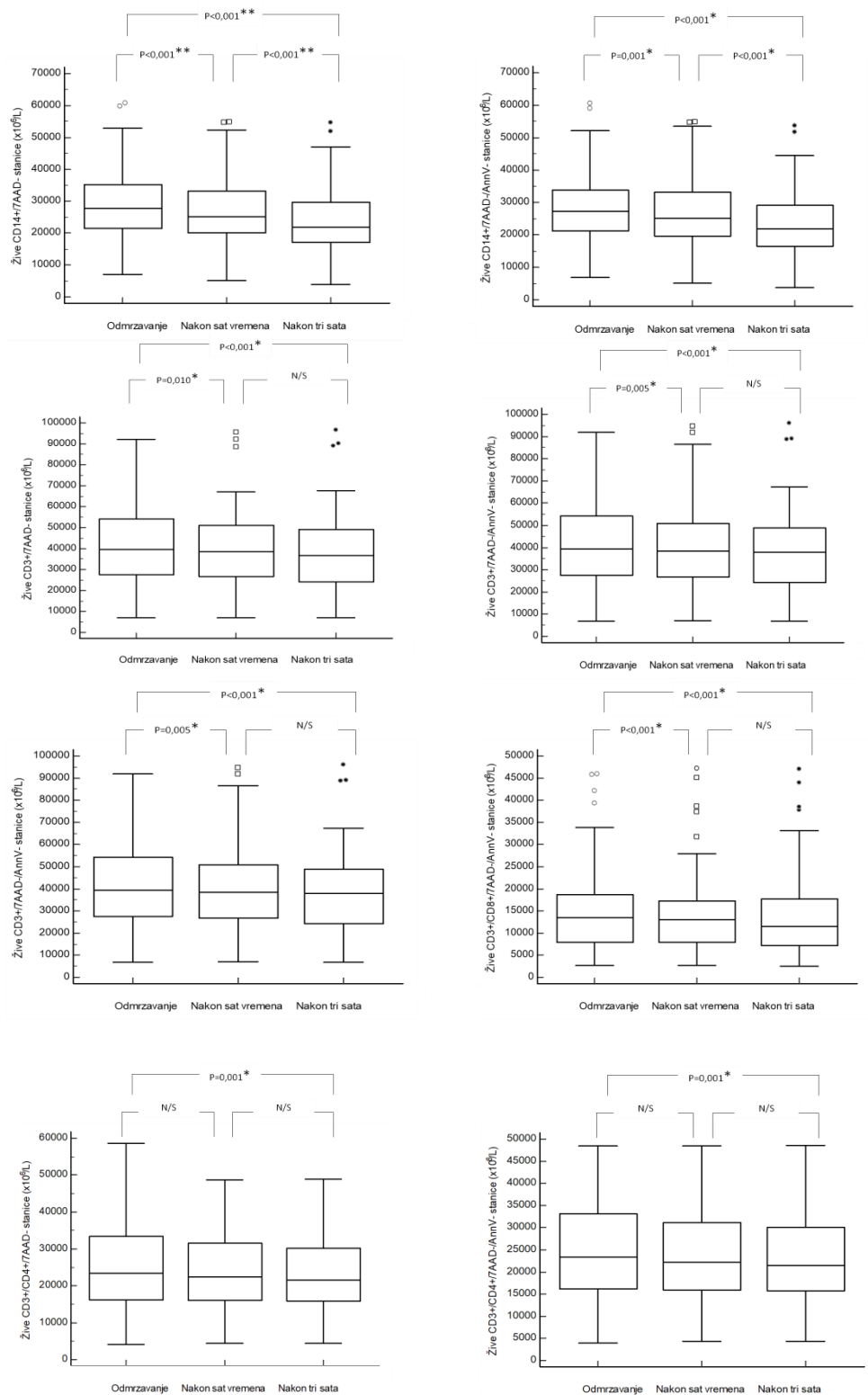
Za apsolutni broj živih CD3+/CD4+ stanica nađena je statistički značajna razlika između rezultata izmjerenih odmah nakon odmrzavanja i tri sata nakon odmrzavanja, za obje metode za određivanje vijabilnosti stanica (7-AAD metoda $P < 0,001$; 7-AAD/aneksin V metoda $P < 0,001$) (Slika 10). Statistički značajna razlika dobivena je i kod usporedbe rezultata postotka živih CD3+/CD4+ stanica izmjerenih odmah nakon odmrzavanja s rezultatima sat vremena i

tri sata nakon odmrzavanja kada je korištena 7-AAD/aneksin V metoda ($P = 0,003$) (Slika 11).

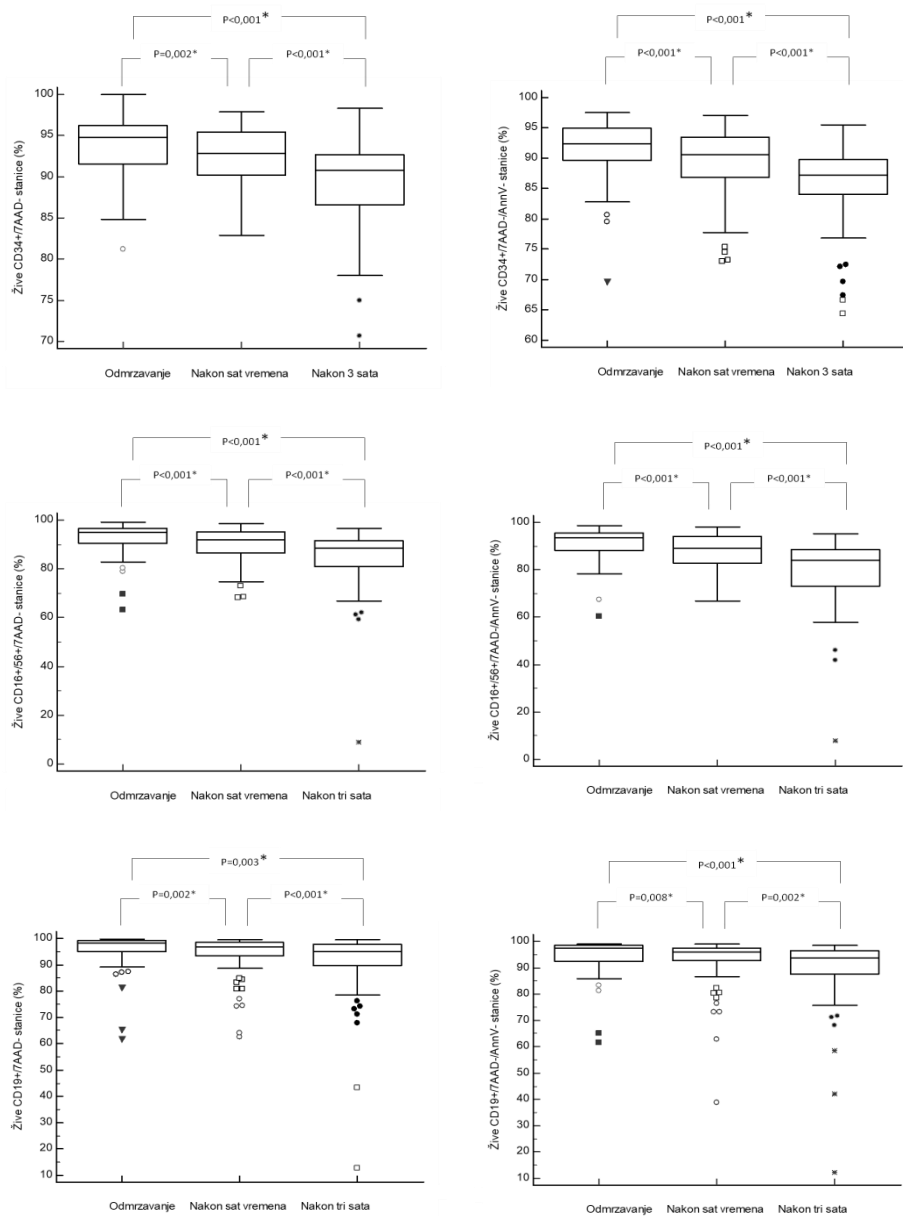


Slika 10. Prikazi apsolutnih brojeva živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autogenih i alogenih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*), 7-AAD – 7-amino aktinomycin D; Ann V-aneksin V

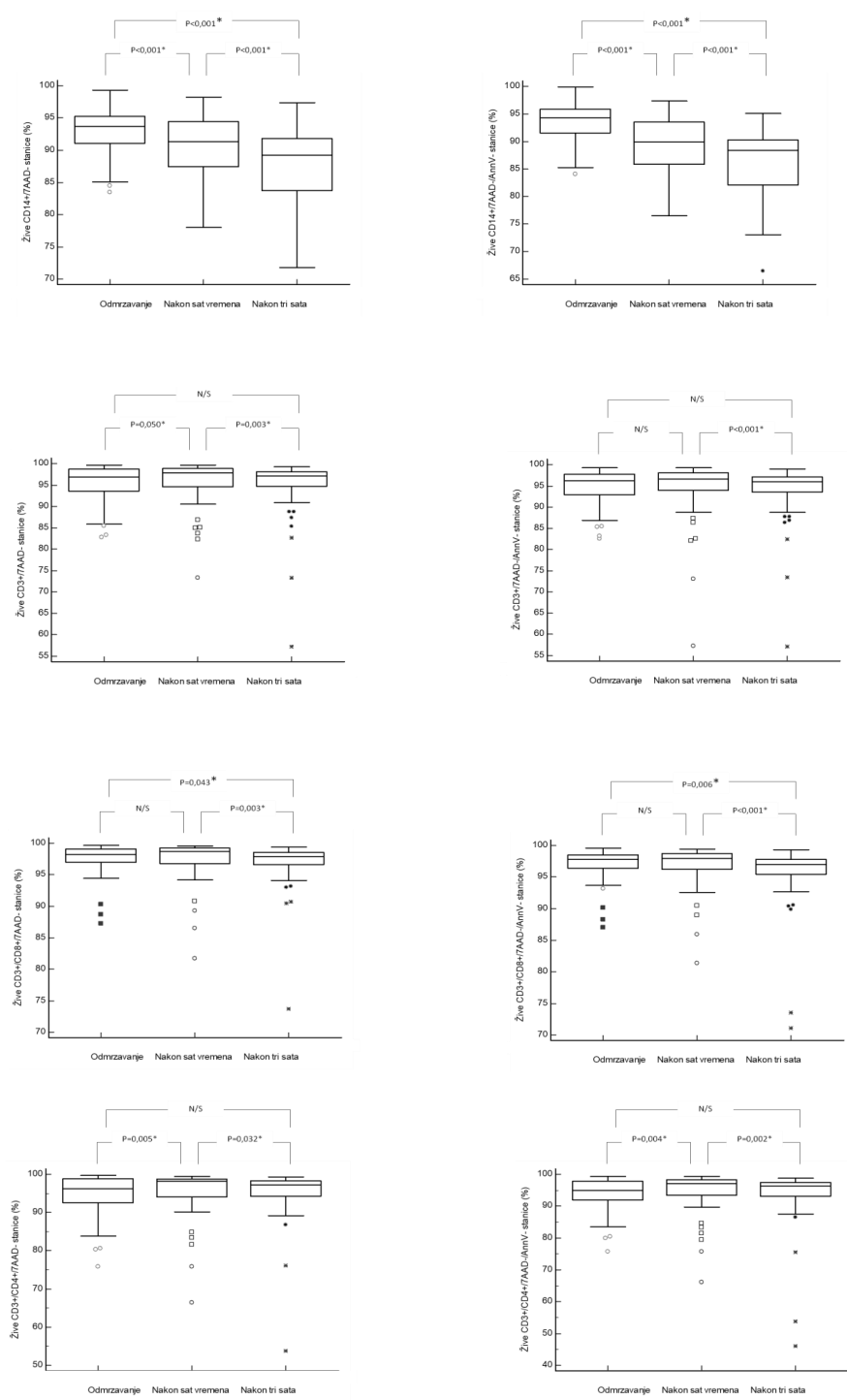


Slika 10 (nastavak). Prikazi apsolutnih brojeva živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih i alogenih pripravaka.



Slika 11. Prikazi postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih i alogenih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*), 7-AAD – 7-amino aktinomicin D; Ann V-aneksin V

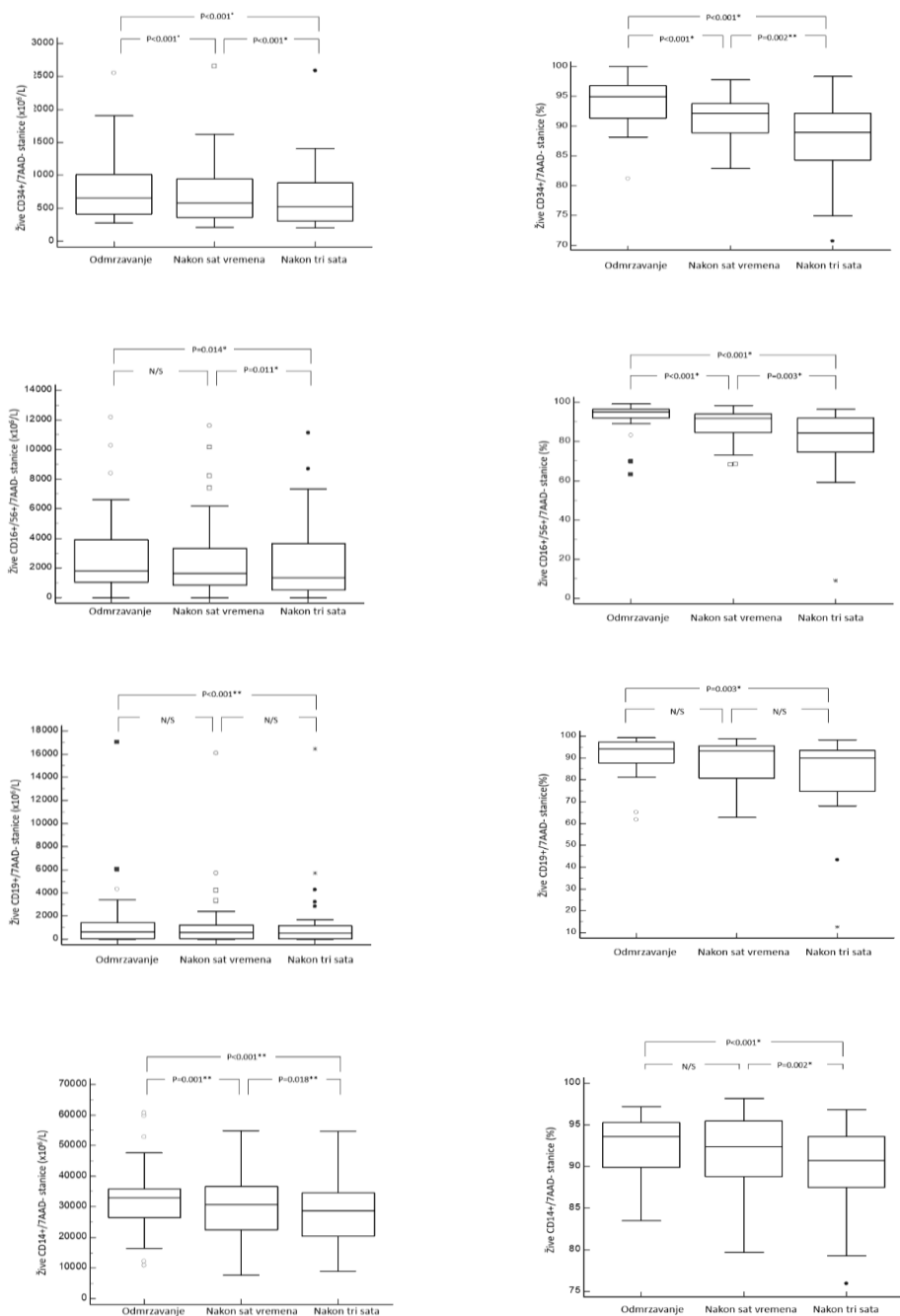


Slika 11 (nastavak). Prikazi postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih i alogenih pripravaka.

Kada su autologni i alogeni uzorci analizirani odvojeno, u uzorcima autolognih pripravaka utvrđena je statistički značajna razlika između svih točaka mjerenja za apsolutni broj živih CD34+ ($P < 0,001$), CD14+ ($P < 0,001$) i CD3+/CD8+ stanica ($P = 0,001$), odnosno za postotak živih CD34+ ($P < 0,001$) i CD56+/16+ stanica ($P < 0,001$) kada je vijabilnost određivanja standardnom 7-AAD metodom (Slika 12).

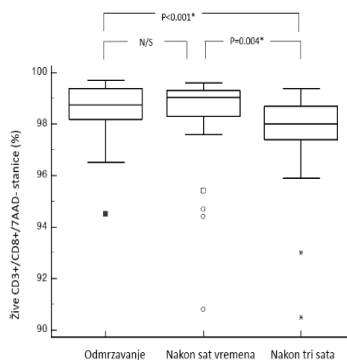
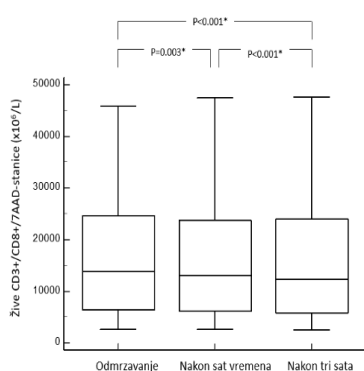
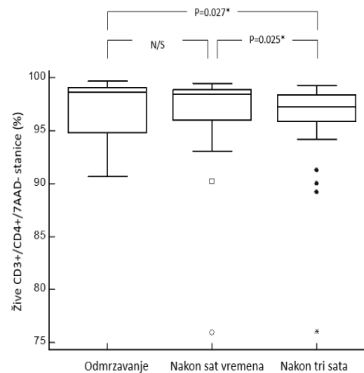
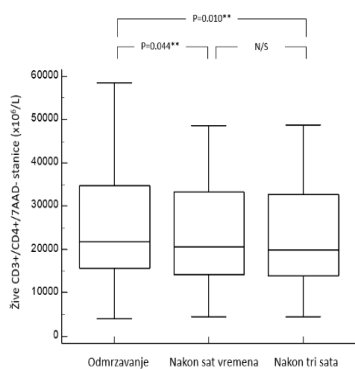
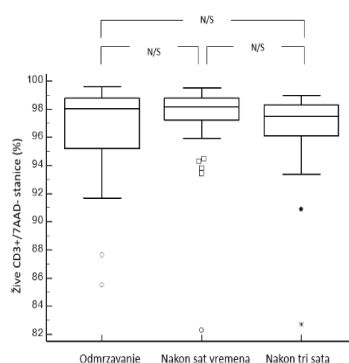
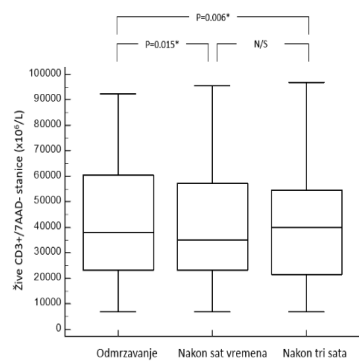
U uzorcima alogenih pripravaka statistički značajna razlika utvrđena je za apsolutni broj živih CD34+ stanica ($P = 0,001$), CD14+ ($P = 0,001$) i CD19+ stanica ($P = 0,001$), odnosno za postotak živih CD56+/16+ ($P < 0,001$), CD14+ ($P < 0,001$) i CD19+ stanica ($P < 0,001$) kada je vijabilnost određivanja standardnom 7-AAD metodom (Slika 13).

Kada je vijabilnost određivana 7-AAD/aneksin V metodom, u uzorcima autolognih pripravaka statistički značajna razlika u svim točkama mjerenja utvrđena je za apsolutni broj živih CD34+ stanica ($P < 0,001$) i za postotak živih CD34+ stanica ($P < 0,001$), te za postotak CD14+ ($P < 0,001$) i CD16+/56+ stanica ($P < 0,001$) (Slika 14). Statistički značajna razlika između svih točaka mjerenja u uzorcima alogenih pripravaka utvrđena je za apsolutni broj živih CD34+ stanica ($P < 0,001$), te za apsolutni broj i postotak živih CD16+/56+ (apsolutni broj $P < 0,001$, postotak $P < 0,001$) CD19+ (apsolutni broj $P < 0,001$, postotak $P < 0,001$) i CD14+ stanica (apsolutni broj $P < 0,001$, postotak $P < 0,001$) (Slika 15).

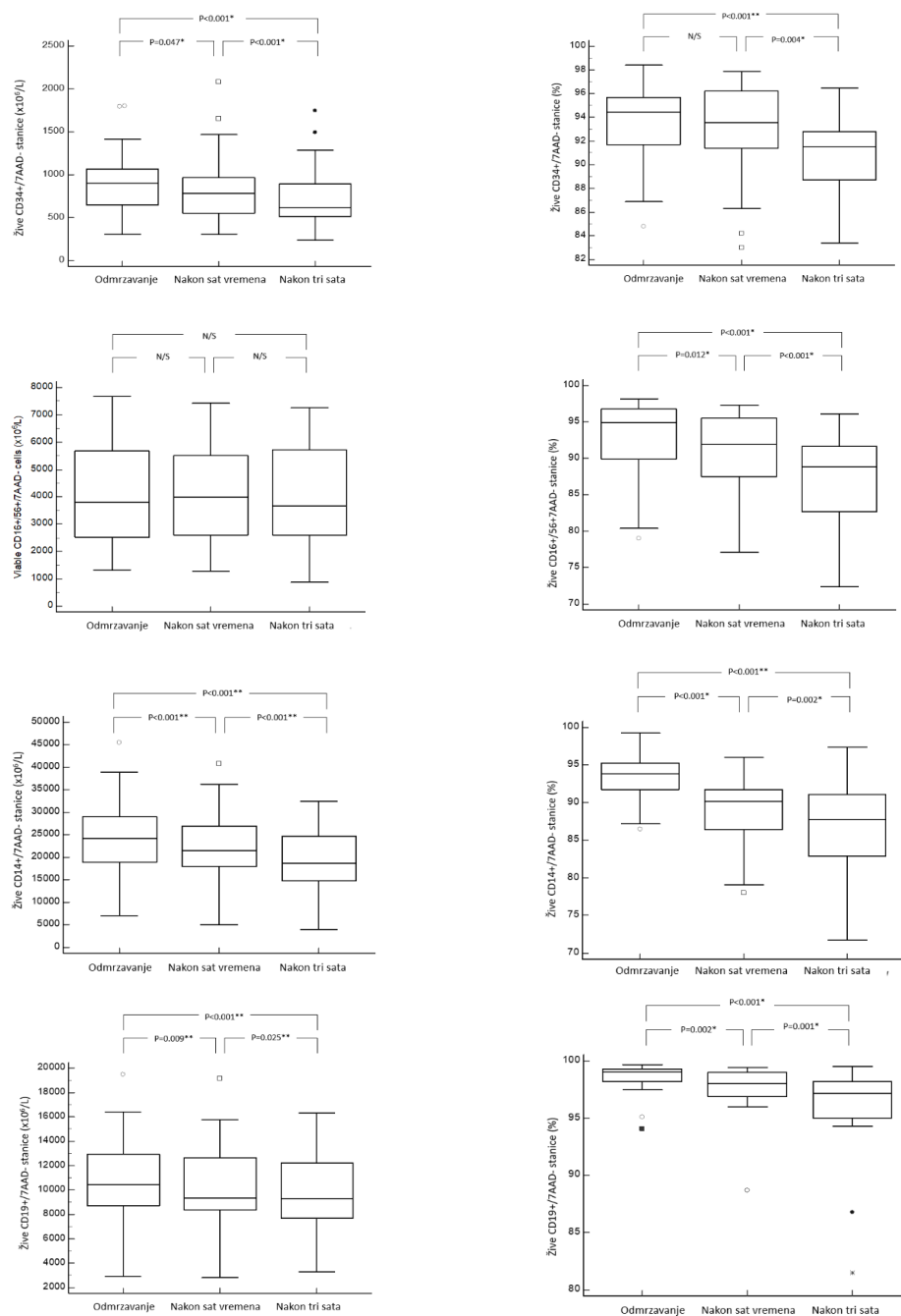


Slika 12. Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozastitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*), 7-AAD – 7-amino aktinomicin D

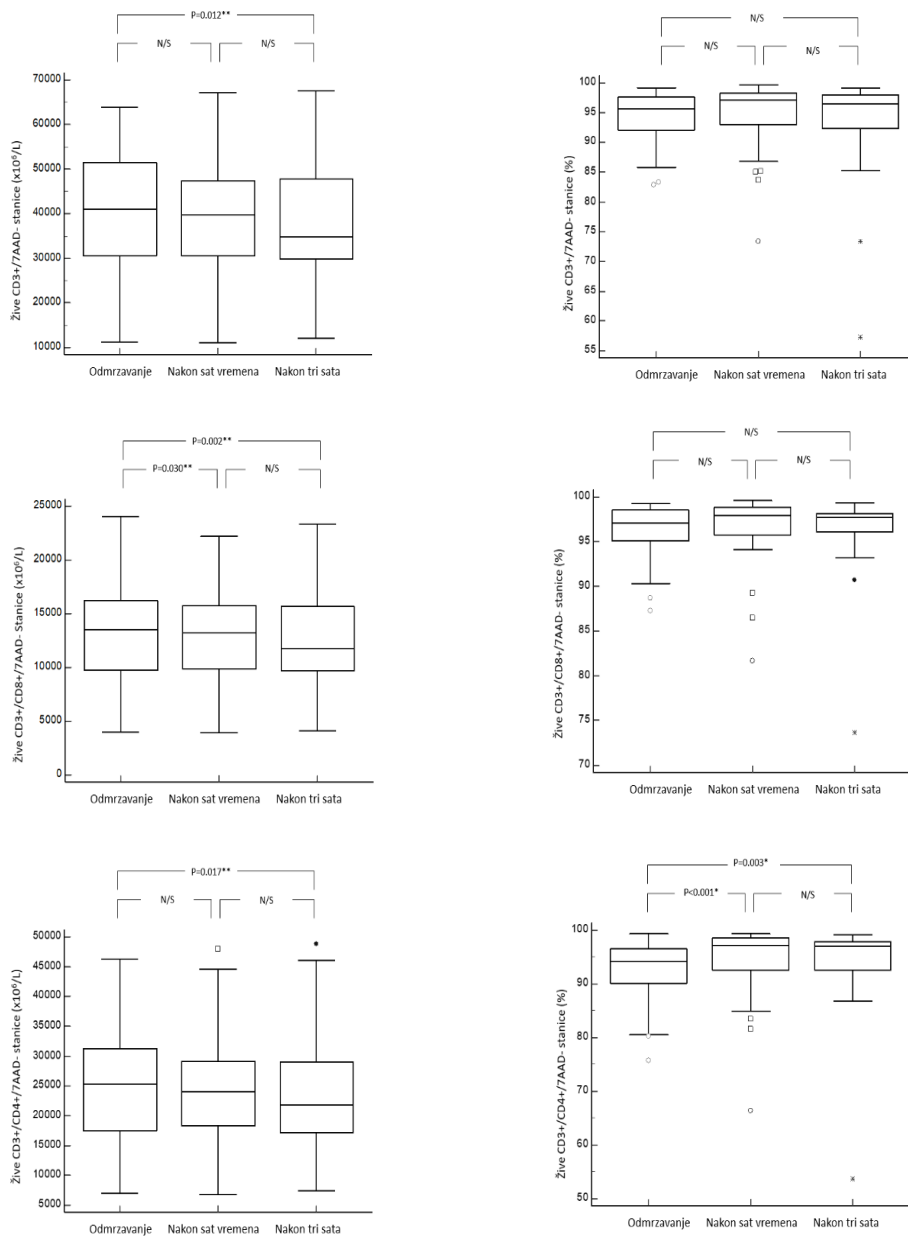


Slika 12 (nastavak). Prikazi apsolutnih brojeva i postotka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autologih pripravaka.

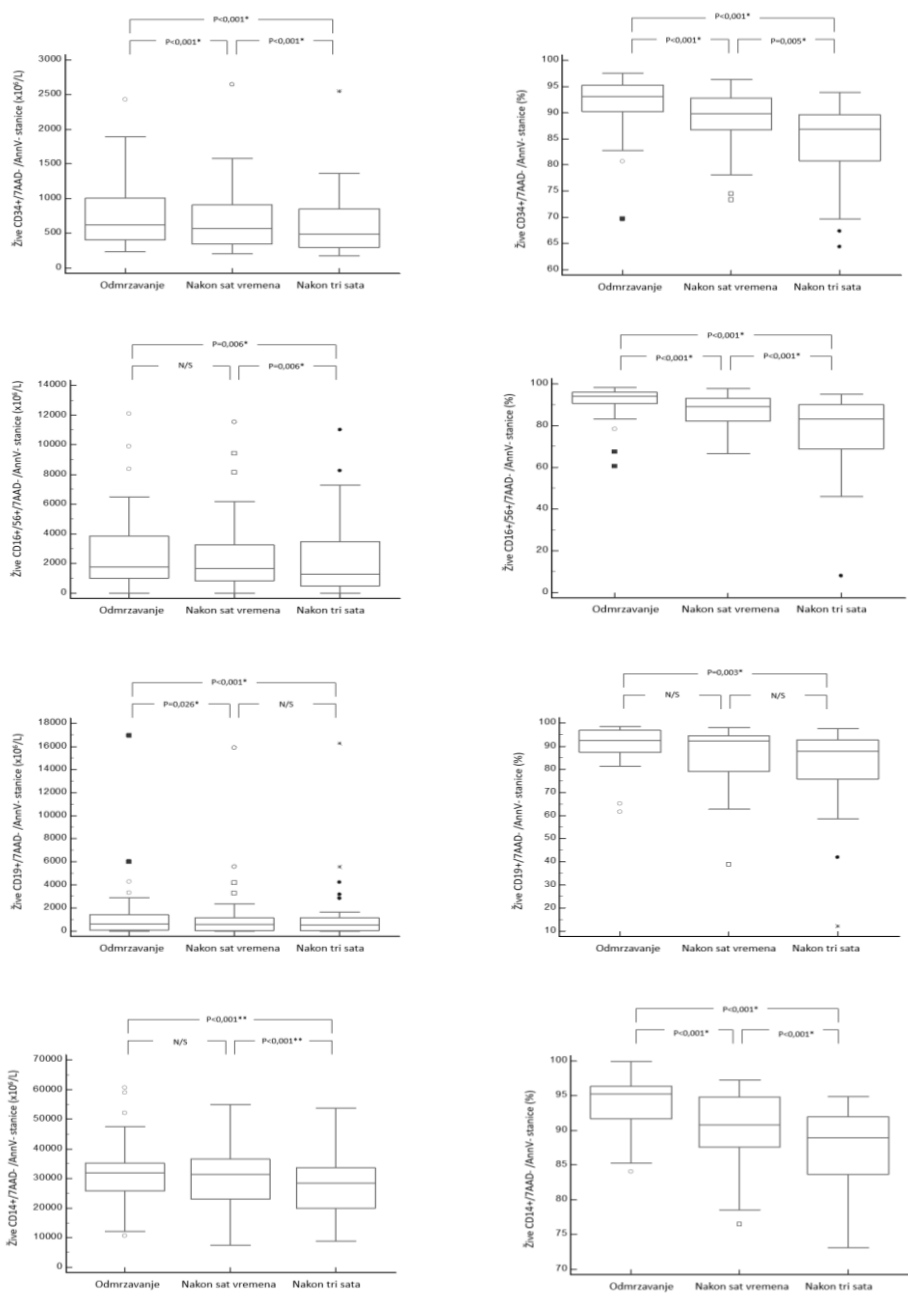


Slika 13. Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima alogenih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*), 7-AAD – 7-amino aktinomicin D

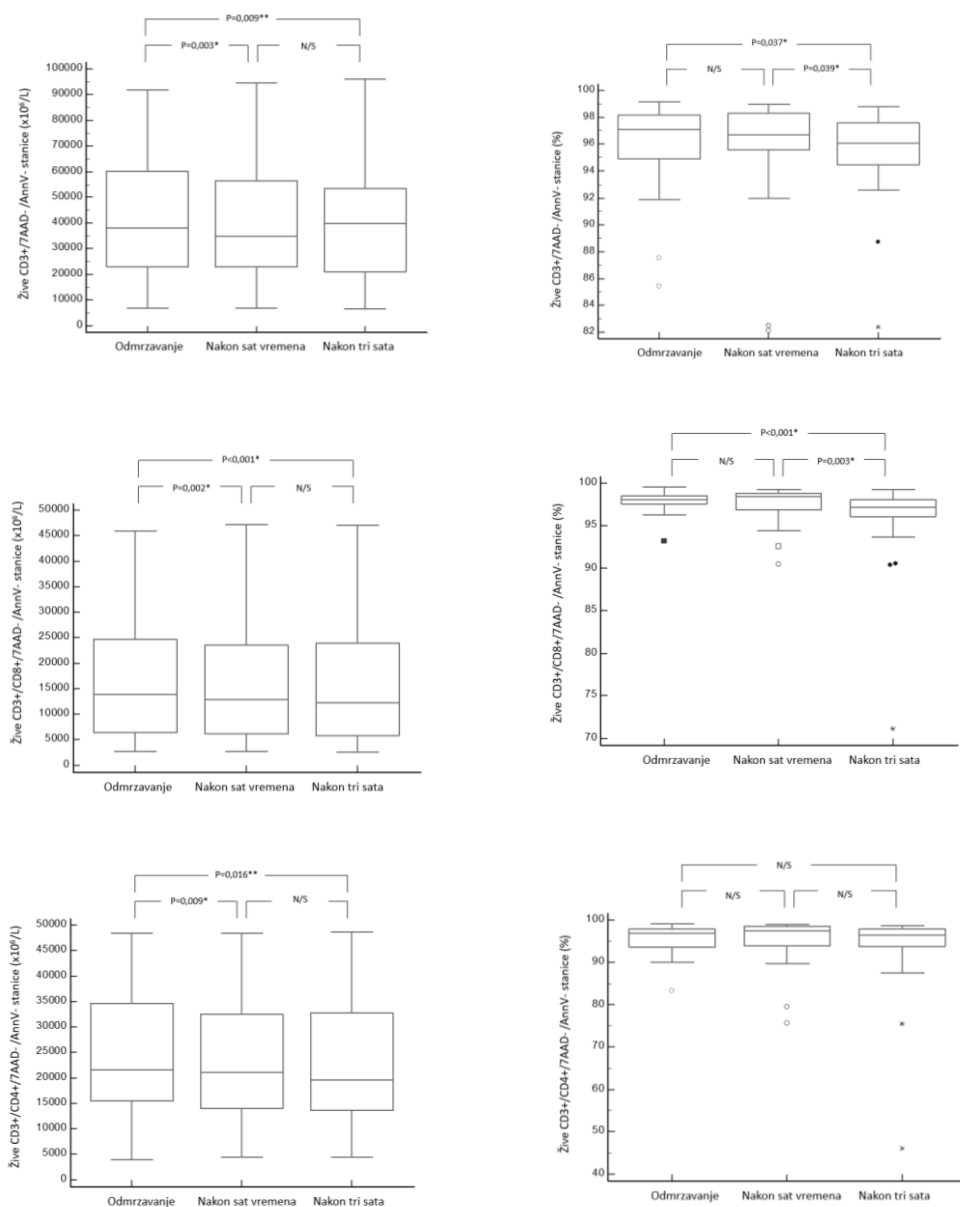


Slika 13 (nastavak). Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih standardnom 7-AAD metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima alogenih pripravaka.

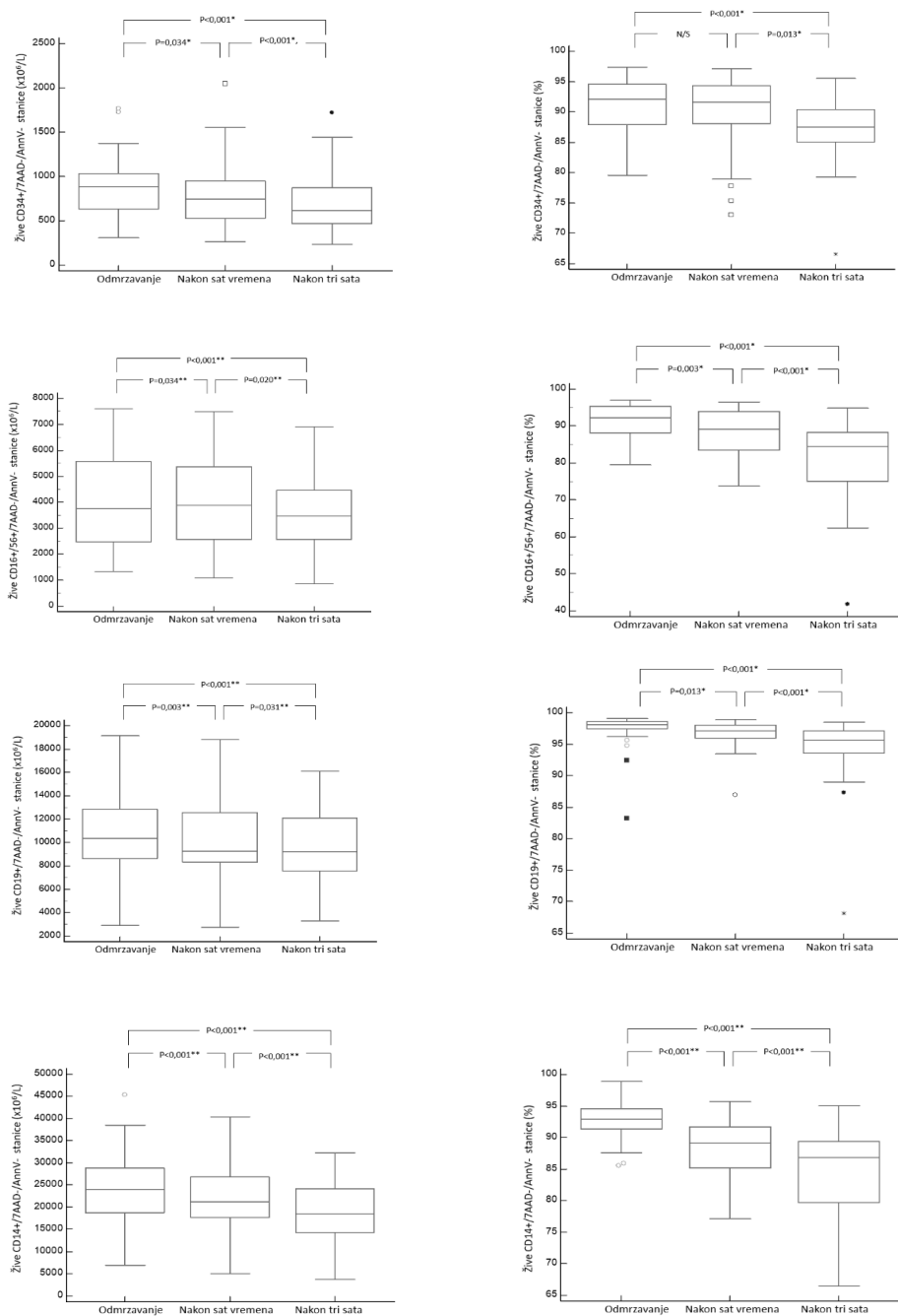


Slika 14. Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autoložnih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*); 7-AAD – 7-amino aktinomicin D, Ann V-aneksin V;

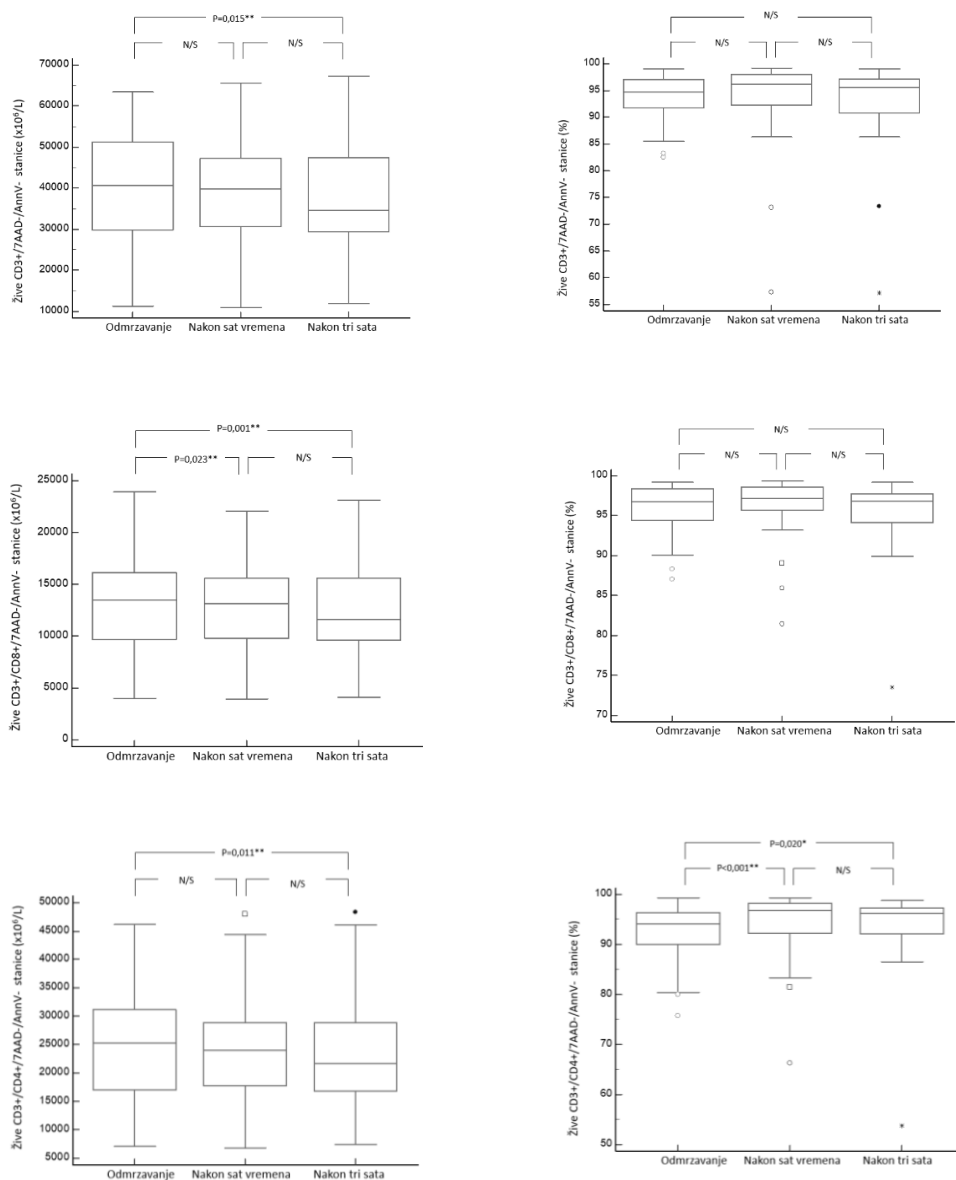


Slika 14 (nastavak). Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autoložnih pripravaka.



Slika 15. Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima alogenih pripravaka.

statistički značajna razlika dobivena je Wilcoxonovim testom sume rangova* i parnim t-testom** za zavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim; N/S – nije statistički značajno (engl. *not-significant*); 7-AAD – 7-amino aktinomycin D, Ann V-aneksin V;



Slika 15 (nastavak). Prikazi apsolutnih brojeva i postotaka živih KMS-a i subpopulacija leukocita određenih 7-AAD/aneksin V metodom kod ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u uzorcima autoložnih pripravaka.

4.8.1. Usporedba rezultata ispitivanja utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja između uzoraka autolognih i alogenih pripravka stanica

Statistički značajna razlika nađena je za CD19+ stanice između sve tri vremenske točke mjerenja za apsolutni broj i postotak živih CD19+ stanica, bez obzira koja metoda je bila korištena za određivanje vijabilnosti (7-AAD metoda $P < 0,001$; 7-AAD/aneksin V metoda $P < 0,001$) (Tablica 11, Tablica 12).

U svim vremenskim točkama mjerenja nađena je i statistički značajna razlika između rezultata apsolutnih brojeva živih CD14+ i CD16+/CD56+ stanica koristeći obje metode za ispitivanje vijabilnost (CD14+ stanice: 7-AAD metoda – po odmrzavanju $P = 0,004$, sat vremena nakon odmrzavanja $P = 0,003$, tri sata nakon odmrzavanja $P < 0,001$; 7-AAD/aneksin V metoda po odmrzavanju $P = 0,005$, sat vremena nakon odmrzavanja $P = 0,002$, tri sata nakon odmrzavanja $P < 0,001$; CD16+/CD56+ stanice: 7-AAD metoda – po odmrzavanju $P = 0,002$, sat vremena nakon odmrzavanja $P = 0,003$, tri sata nakon odmrzavanja $P = 0,003$; 7-AAD/aneksin V metoda po odmrzavanju $P = 0,002$, sat vremena nakon odmrzavanja $P = 0,003$, tri sata nakon odmrzavanja $P = 0,005$;). Statistički značajna razlika nađena je i za rezultate izmjerene sat vremena ($P = 0,019$) i tri sata nakon odmrzavanja ($P = 0,033$) za postotak živih CD14+ stanica koristeći 7-AAD metodu (Tablica 11, Tablica 12).

Analizom limfocita T dobivena je statistički značajna razlika za postotak živih stanica za rezultate izmjerene odmah nakon odmrzavanja bez obzira koja metoda je korištena za određivanje vijabilnosti stanica (CD3+ stanice: 7-AAD metoda $P = 0,011$, 7-AAD/aneksin V metoda $P = 0,017$; CD3+/CD8+ stanice: 7-AAD metoda $P < 0,001$, 7-AAD/aneksin V metoda $P = 0,004$; CD3+/CD4 stanice: 7-AAD metoda $P = 0,011$, 7-AAD/aneksin V metoda $P = 0,033$). Statistički značajna razlika nađena je između uzoraka autolognih i alogenih pripravaka i kod rezultata izmjerenih sat vremena nakon odmrzavanja za postotak CD3+ i CD3/CD8+ stanica koristeći 7-AAD metodu (CD3+ stanice $P = 0,016$; CD3+/CD8+ stanice $P = 0,031$) (Tablica 11, Tablica 12).

Tablica 11. Utjecaj vrste davatelja i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja na vijabilnosti stanica određen standardnom 7-AAD metodom

		Odmrzavanje			Sat vremena nakon odmrzavanja			Tri sata nakon odmrzavanja		
Stanice	Mjerna jedinica	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P
CD34+/7AAD-	x10 ⁶ /L	655 (414 – 1010)	902 (647 – 1064)	0,214	581 (364 – 947)	789 (554 – 970)	0,141	523 (300 -886)	622 (511 – 894)	0,139
	%	94,9 (91,4 – 96,8)	94,5 (91,7 – 95,7)	0,433	92,2 (88,9 – 93,8)	93,6 (91,4 – 96,2)	0,080	89,0 (84,3 – 92,2)	91,5 (88,7 - 92,8)	0,044
CD14+/7AAD-	x10 ⁶ /L	33039 (26507 – 35916)	24231 (18903 – 29026)	0,004**	30750 (22329 – 36557)	21432 (18052 – 26929)	0,003**	28688 (20295 – 34473)	18646 (14810 – 24614)	<0,001**
	%	93,6 (89,9 – 95,3)	93,9 (91,8 – 95,3)	0,530	92,4 (88,8 – 95,5)	90,2 (86,4 – 91,8)	0,019*	90,8 (87,5 – 93,6)	87,8 (82,9 – 91,1)	0,033*
CD19+/7AAD-	x10 ⁶ /L	636 (34 – 1438)	10444 (8425 – 12956)	<0,001*	576 (32 – 1191)	9335 (8366 – 12648)	<0,001*	545 (29 – 1150)	9301 (7715 – 12230)	<0,001*
	%	94,2 (87,8 – 97,5)	99,1 (98,2 – 99,3)	<0,001*	93,2 (80,7 – 95,7)	98,1 (96,9 – 99,0)	<0,001*	89,9 (74,8 -93,6)	97,2 (95,0 – 98,2)	<0,001*
CD16+/CD56+/ 7AAD-	x10 ⁶ /L	1796 (1062 – 3909)	3796 (2513 – 5683)	0,002*	1646 (844 – 3335)	3988 (2613 – 5502)	0,003*	1362 (539 – 3676)	3671 (2610 – 5713)	0,003*
	%	94,9 (92,1 – 96,6)	94,9 (89,9 – 96,8)	0,060	91,8 (84,6 – 94,2)	91,9 (87,5 – 95,5)	0,396	84,3 (74,7 – 92,0)	88,8 (82,7 – 91,7)	0,297
CD3+/7AAD-	x10 ⁶ /L	38258 (23319 – 60413)	40996 (30666 – 51361)	0,836	35255 (23128 – 57315)	39786 (30676 – 47518)	0,941	40118 (21728 – 54671)	34766 (29906 – 47755)	0,971
	%	98,1 (95,2 – 98,8)	95,7 (92,1 – 97,6)	0,011*	98,2 (97,2 – 98,8)	97,2 (93,1 – 98,3)	0,016*	97,5 (96,1 – 98,3)	96,5 (92,3 – 98,0)	0,069
CD3+/CD8+/ 7AAD-	x10 ⁶ /L	13919 (6400 – 24697)	13558 (9726 – 16183)	0,790	13102 (6124 – 23765)	13168 (9851 – 15701)	0,976	12430 (5930 – 24066)	11706 (9657 – 15657)	0,918
	%	98,8 (98,2 – 99,4)	97,1 (95,1 – 98,6)	<0,001*	99,1 (98,3 – 99,3)	97,9 (95,8 – 98,9)	0,031*	98,0 (97,4 – 98,7)	97,8 (96,1 – 98,2)	0,080
CD3+/CD4+/ 7AAD-	x10 ⁶ /L	21765 (15633 – 34787)	25323 (17527 – 31264)	0,714	20720 (14164 – 33216)	24080 (18281 – 29061)	0,530	19765 (13880 – 32880)	21801 (17096 – 29041)	0,584
	%	98,6 (94,8 – 99,1)	94,3 (90,1 – 96,5)	<0,001*	98,5 (96,0 – 98,9)	97,3 (92,6 – 98,5)	0,068	97,3 (95,9 – 98,4)	97,1 (92,6 – 97,9)	0,217

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je *Mann-Whitney testom i **t-testom za nezavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**); N - broj uzoraka, 7-AAD – 7-amino aktinomicin D

Tablica 12. Utjecaj vrste davatelja i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja na vijabilnosti stanica određen kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom.

		Odmrzavanje			Sat vremena nakon odmrzavanja			Tri sata nakon odmrzavanja		
Stanice	Mjerna jedinica	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P	Autologni (N=30)	Alogeni (N=30)	P
CD34+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	622 (409 – 1007)	888 (635 – 1036)	0,234	571 (341 – 916)	746 (525 – 949)	0,196	491 (297 – 853)	617 (464 – 875)	0,122
	%	93,1 (90,2 – 95,3)	92,1 (87,9 – 94,6)	0,223	89,9 (86,8 – 92,8)	91,6 (88,1 – 94,3)	0,188	86,9 (80,8 – 89,7)	87,5 (85,1 – 90,4)	0,209
CD14+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	31864 (25671 – 35157)	24031 (18808 – 28808)	0,005**	31394 (23020 – 36629)	21257 (17717 – 26835)	0,002**	28455 (19954 – 33602)	18495 (14243 – 24183)	<0,001**
	%	95,3 (91,7 – 96,4)	93,0 (91,3 – 94,6)	0,050	90,8 (87,6 – 94,8)	89,2 (85,2 – 91,7)	0,085	89,0 (83,7 – 92,0)	86,8 (79,7 – 89,4)	0,065
CD19+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	634 (91 – 1378)	10342 (8648 – 12846)	<0,001*	556 (31 – 1165)	9257 (8322 – 12551)	<0,001*	534 (27 – 1137)	9185 (7578 – 12086)	<0,001*
	%	92,5 (87,3 – 97,0)	98,1 (97,5 – 98,6)	<0,001*	92,3 (79,0 – 94,6)	97,1 (96,0 – 98,0)	<0,001*	87,8 (75,9 – 92,7)	95,6 (93,6 – 97,1)	<0,001*
CD16+/CD56+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	1764 (996 – 3848)	3745 (2481 – 5575)	0,002*	1629 (806 – 3257)	3889 (2562 – 5377)	0,003*	1285 (468 – 3490)	3467 (2550 – 4467)	0,005*
	%	94,1 (90,7 – 95,9)	92,1 (88,2 – 95,3)	0,276	89,0 (82,2 – 93,2)	89,2 (83,5 – 94,0)	0,785	83,2 (68,9 – 90,1)	84,6 (75,0 – 88,3)	0,994
CD3+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	38093 (23050 – 60197)	40710 (29774 – 51241)	0,883	34857 (23015 – 56622)	39728 (30579 – 47217)	0,953	39662 (20993 – 53482)	34630 (29288 – 47447)	0,976
	%	97,1 (94,9 – 98,2)	94,8 (91,7 – 97,0)	0,017*	96,7 (95,6 – 98,3)	96,2 (92,3 – 98,0)	0,222	96,1 (94,5 – 97,6)	95,6 (90,8 – 97,1)	0,217
CD3+/CD8+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	13832 (6382 – 24638)	13447 (9672 – 16140)	0,790	12995 (6117 – 23610)	13119 (9813 – 15608)	0,965	12318 (5920 – 23991)	11573 (9599 – 15608)	0,918
	%	98,1 (97,6 – 98,6)	96,8 (94,4 – 98,4)	0,004*	98,5 (96,9 – 98,8)	97,2 (95,7 – 98,6)	0,145	97,2 (96,1 – 98,1)	96,8 (94,2 – 97,8)	0,237
CD3+/CD4+/7AAD-/AnnV-	x10 ⁶ /L	21573 (15512 – 34677)	25234 (17012 – 31152)	0,606	21050 (13994 – 32534)	23946 (17729 – 28932)	0,525	19652 (13580 – 32809)	21675 (16812 – 28930)	0,572
	%	97,0 (93,6 – 98,0)	94,1 (90,0 – 96,4)	0,033*	97,4 (94,0 – 98,6)	96,8 (92,3 – 98,3)	0,429	96,5 (93,7 – 97,9)	96,3 (92,1 – 97,3)	0,530

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima; statistički značajna razlika dobivena je *Mann-Whitney testom i **t-testom za nezavisne uzorke; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**) N -broj uzoraka; Ann V-aneksin V

4.8.2. Utjecaj vremena pohrane svježih alogenih pripravaka i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja na vijabilnosti stanica 7-AAD metodom i kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom

Stabilnost odmrznutih kripohranjenih uzoraka analizirana je za alogene pripravke leukaferoze koji su prije kriopohrane bili pohranjeni u kontroliranim uvjetima manje od 24 sata (N = 20) i za one koji su bili pohranjeni više od 24 sata (N=10). Nije nađena statistički značajna razlika ni za jednu subpopulaciju leukocita u ispitivanom vremenskom razdoblju, osim za apsolutni broj živih CD3+/CD4+ stanica za rezultate izmjerene tri sata nakon odmrzavanja (P=0,028) (Tablica 13).

Statistički značajna razlika dobivena je za rezultate postotaka živih CD14+ (P = 0,004) i CD16+/56+ stanica (P = 0,011) izmjerenih odmah nakon odmrzavanja. Za postotak živih CD16+/56+ stanica statistički značajna razlika nađena je i kod rezultata izmjerenih sat vremena nakon odmrzavanja (P = 0,005). Analizom rezultata postotaka živih stanica subpopulacija limfocita T statistički značajna razlika nađena je za rezultate u svim vremenskim točkama (Tablica 13).

Tablica 13. Utjecaj vremena pohrane svježih alogenih pripravaka i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini na vijabilnosti stanica

		Odmrzavanje				Sat vremena nakon odmrzavanja			Tri sata nakon odmrzavanja		
Stanice	Metoda	Mjerna jedinica	Vrijeme pohrane <24h (N=10)	Vrijeme pohrane ≥24h (N=20)	P	Vrijeme pohrane <24h (N=10)	Vrijeme pohrane ≥24h (N=20)	P	Vrijeme pohrane <24h (N=10)	Vrijeme pohrane ≥24h (N=20)	P
CD34+	7-AAD	x10 ⁶ /L	784 (620 – 1028)	913 (663 – 1071)	0,338	819 (502 – 1019)	789 (602 – 956)	0,860	616 (460 – 894)	656 (524 – 894)	0,482
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	777 (542 – 1016)	897 (654 – 1045)	0,363	810 (442 – 1011)	736 (573 – 937)	0,895	597 (438– 882)	628 (493 – 854)	0,598
	7-AAD	%	95,0 (91,4 – 95,7)	93,8 (91,8 – 95,6)	0,775	94,8 (92,1 – 96,5)	93,5 (91,1 – 95,7)	0,355	91,4 (87,3 – 92,4)	91,6 (88,8 – 94,0)	0,628
	7-AAD /Ann V	%	92,2 (89,0 – 94,6)	92,1 (87,7 – 94,1)	0,89	94,8 (92,1 – 96,5)	91,1 (87,4 – 93,9)	0,202	86,7 (85,0 – 89,8)	87,5 (85,7 – 90,8)	0,538
CD14+	7-AAD	x10 ⁶ /L	20577 (14962–26572)	25049 (21855–30287)	0,153	19825 (14952-21770)	23951 (18756 – 27341)	0,177	15848 (11244-18363)	20011 (16752 – 25124)	0,107
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	20474 (14821-26338)	24846 (21555- 30138)	0,156	19569 (14836-21630)	23715 (18496 – 27138)	0,177	15626 (10626-18235)	19829 (16463 – 24706)	0,107
	7-AAD	%	95,6 (94,7 – 97,1)	92,9 (90,6 – 94,3)	0,004*	91,7 (90,0 – 94,6)	88,6 (85,8 – 91,2)	0,265	89,1 (83,3 – 92,9)	86,8 (81,6 – 90,0)	0,470
	7-AAD /Ann V	%	95,1 (94,2 – 96,2)	92,5 (89,8 – 93,3)	0,005*	90,9 (89,2 – 93,9)	88,2 (84,7 – 90,9)	0,129	88,4 (80,6 – 91,6)	86,2 (79,6 – 89,2)	0,681
CD19+	7-AAD	x10 ⁶ /L	10276 (9070-12183)	10962 (8538 – 13690)	0,575	9272 (8758-12152)	9335 (8360 – 13283)	0,451	8806 (7374-11663)	9394 (8007 – 12677)	0,591
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	10184 (8961-12086)	10861 (8483 – 13557)	0,586	9189 (8680-12029)	9257 (8306 – 13111)	0,490	8555 (7229-11529)	9256 (7889 – 12375)	0,567
	7-AAD	%	99,3 (99,0 - 99,4)	98,9 (98,1 – 99,3)	0,055	98,9 (98,1 - 99,1)	97,7 (96,8 – 98,7)	0,113	97,2 (96,4 – 98,4)	97,2 (94,9 – 98,2)	0,644
	7-AAD /Ann V	%	98,6 (98,0 – 98,9)	98,0 (97,3 – 98,4)	0,026*	97,8 (97,3 – 98,4)	96,7 (95,8 – 97,5)	0,061	96,2 (95,1 – 97,7)	95,6 (93,5 – 96,9)	0,291

Tablica 13. (nastavak) Utjecaj vremena pohrane svježih alogenih pripravaka i dužine izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini na vijabilnosti stanica

CD16+ /CD56 +	7-AAD	x10 ⁶ /L	3711 (2513-5206)	4091 (2706 – 6057)	0,547	3930 (2613-4563)	4162 (2494 – 5519)	0,745	3527 (2610-4535)	3923 (2580 – 5746)	0,604
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	3681 (2481-5174)	4006 (2684 – 6003)	0,542	3852 (2562-4477)	3931 (2404 – 5407)	0,830	3467 (2550-4127)	3524 (2523 – 5407)	0,684
	7-AAD	%	97,2 (95,9 – 97,7)	91,9 (89,8 – 95,4)	0,011*	95,4 (93,8 – 96,3)	89,9 (86,7 – 93,2)	0,005*	90,2 (89,5 – 91,7)	85,7 (80,7 – 91,9)	0,280
	7-AAD /Ann V	%	95,7 (92,0 – 96,8)	89,4 (87,9 – 93,8)	0,022*	94,2 (90,0 – 94,4)	85,1 (81,7 – 91,0)	0,014*	86,5 (83,6 – 88,1)	78,2 (73,6 – 88,4)	0,673
CD3+	7-AAD	x10 ⁶ /L	47262 (45244-54249)	34345 (27547–45465)	0,068	45860 (40475-50631)	32518 (26965-45277)	0,086	47745 (34514-49932)	32660 (26180-43133)	0,078
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	47398 (45384-54317)	34215 (27472-45449)	0,059	46073 (40563-50655)	32375 (26844-45356)	0,071	48155 (32520-54713)	32226 (25931-42645)	0,068
	7-AAD	%	98,2 (97,0 – 98,9)	93,5 (89,5 – 96,3)	0,001*	98,5 (97,9 – 99,0)	94,5 (88,7 – 97,2)	<0,001*	98,2 (98,0 – 98,8)	94,7 (88,8 – 96,5)	<0,001*
	7-AAD /Ann V	%	97,8 (96,5 – 98,5)	93,1 (89,4 – 95,9)	0,001*	98,2 (97,4 – 98,8)	94,0 (88,8 – 96,8)	<0,001*	97,3 (96,7 – 97,9)	93,8 (87,8 – 95,7)	<0,001*
CD3+/ CD8+	7-AAD	x10 ⁶ /L	15625 (12370-18769)	12927 (9537 – 15560)	0,213	14743 (11810-16087)	12385 (9333 – 14752)	0,288	13861 (9797-18301)	11645 (9651 – 14012)	0,247
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	15628 (12276-18727)	12768 (9494 – 15525)	0,207	14671 (11761-16023)	12055 (9284 – 14606)	0,281	13776 (9648-17898)	11417 (9587 – 13886)	0,256
	7-AAD	%	99,0 (98,6-99,1)	96,1 (94,5 – 97,1)	<0,001*	99,3 (98,7 – 99,5)	96,6 (94,6 – 98,2)	<0,001*	98,4 (97,9 – 98,9)	96,5 (94,6 – 97,9)	0,002*
	7-AAD /Ann V	%	98,5 (98,4 – 98,7)	95,0 (94,1 – 97,0)	<0,001*	98,6 (98,2 – 99,1)	96,3 (93,7 – 98,0)	0,001*	97,5 (96,6 – 97,9)	95,5 (93,9 – 97,5)	0,015*
CD3+/ CD4+	7-AAD	x10 ⁶ /L	29311 (27659-40131)	21608 (16361–27692)	0,052	28612 (24480-38021)	21404 (16696 – 26764)	0,064	28016 (23515-36943)	21262 (16196 – 25116)	0,028*
	7-AAD /Ann V	x10 ⁶ /L	29291 (27804-40006)	21556 (16309–27603)	0,050	28580 (24467-37839)	21340 (16637 – 26700)	0,064	27732 (23271-36766)	21142 (16106 – 24736)	0,035*
	7-AAD	%	98,1 (96,5 – 98,7)	92,6 (86,7 – 94,6)	<0,001*	98,8 (98,4 – 99,3)	94,6 (90,5 – 97,3)	<0,001*	98,2 (97,8 – 98,8)	94,5 (90,8 – 97,1)	<0,001*
	7-AAD /Ann V	%	97,5 (96,3 – 98,5)	92,8 (86,5 – 94,5)	<0,001*	98,5 (98,2 – 98,8)	94,0 (90,4 – 97,0)	<0,001*	97,4 (97,1 – 98,0)	94,2 (90,6 – 96,5)	<0,001*

Rezultati su prikazani kao medijani s odgovarajućim interkvartilnim rasponima. *statistički značajna razlika dobivena je *Mann-Whitney testom; P < 0,05 smatrao se statistički značajnim (**prikazano podebljano**); N -broj uzoraka; 7-AAD – 7-amino aktinomycin D; Ann V-aneksin V

5. RASPRAVA

Iako su procesi kriopohrane i odmrzavanja standardizirani, i poznat je njihov utjecaj na stanice autolognih pripravaka KMS-a, za ostale subpopulacije leukocita i alogene KMS utjecaj navedenih procesa na njihovu vijabilnost i preživljenje potrebno je dodatno istražiti (90). Zbog očekivanog daljnjeg razvitka i primjene pripravaka za staničnu terapiju potrebno je poznavati i procese te karakteristike svježih i odmrznutih kriopohranjenih pripravaka, koji služe kao ishodišni pripravci za staničnu terapiju. U ovom prospektivnom istraživanju ispitivano je preživljenje nakon odmrzavanja KMS-a i subpopulacija leukocita u autolognim i alogenim pripravcima stanica prikupljanima iz periferne krvi. Ispitan je i utjecaj različitih obilježja pripravaka i uvjeta pohrane prije zamrzavanja na vijabilnost i preživljenje odmrznutih stanica u autolognim i alogenim pripravcima KMS-a.

Budući da ishod transplantacije ovisi o vrsti stanica u pripravcima KMS-a, važno je odrediti sastav pripravka, odnosno subpopulacije leukocita u svježim pripravcima stanica prikupljenih leukaferozom (91). U autolognim svježim pripravcima monociti (CD14+ stanice) su bili najzastupljenija subpopulacija stanica, dok je limfocita B (CD19+ stanica) bilo najmanje. Rezultati objavljenih neovisnih istraživanja također upućuju na to da autologni pripravci sadrže najmanje limfocita B u usporedbi s ostalim subpopulacijama leukocita (limfocita T i NK stanica) (92-94). U pripravcima sedam bolesnika nisu pronađeni limfociti B, dok u jednom nisu pronađene niti NK stanice. Šest bolesnika u čijim pripravcima nisu pronađene navedene subpopulacije stanica liječeni su zbog NHL-a, što je u skladu s rezultatima istraživanja Valtole i sur. u kojem u pripravcima prikupljenima od bolesnika s istom dijagnozom nisu nađeni limfociti B (92). Nedostatak limfocita B u provedenom istraživanju, kao i objavljenim neovisnim istraživanjima povezuje se s dijagnozom, odnosno s vrstom kemoterapije koju su bolesnici primili prije prikupljanja stanica, jer je poznato da rituksimab, lijek koji je sastavni dio kemoterapije bolesnika s NHL-om osim zloćudnih stanica ubija i normalne, zdrave limfocite B (92).

U alogenim svježim pripravcima prikupljenima od zdravih davatelja najzastupljenije stanice bili su limfociti T, dok je najmanje bilo NK stanica, što je u skladu s dosad objavljenim istraživanjima (95).

Za procjenu kvalitete pripravaka za transplantaciju KMS-a i za proizvodnju genetički promijenjenih stanica u pripravcima za staničnu terapiju, potrebno je odrediti broj živih stanica u svježim ishodišnim pripravcima prikupljenima leukaferozom. Kako bi se procijenio utjecaj kriozaštitne otopine na vijabilnost i preživljenje stanica, potrebno je odrediti broj živih

stanica u odmrznutim kriopohranjenim pripravcima, budući da samo žive stanice imaju sposobnost proliferacije.

Vijabilnost, odnosno broj živih stanica u svježim i odmrznutim kriopohranjenim pripravcima KMS-a u rutinskom radu određuje se protočnom citometrijom, najčešće koristeći 7-AAD metodu. U odnosu na metodu s tripanskim modrilom kojom se određuje vijabilnost svih stanica s jezgrom, metoda sa 7-AAD-om povećala je specifičnost procjene kvalitete pripravaka KMS-a, jer omogućuje određivanje vijabilnosti populacija ciljanih stanica (96). Otvoreno je pitanje treba li u kontroli kvalitete pripravaka KMS-a koristiti još osjetljiviju metodu, kojom se mogu odrediti stanice već i u ranoj apoptozi. Pregledom dosad objavljenih istraživanja nije pronađeno niti jedno prospektivno istraživanje koje je uključivalo određivanje vijabilnosti stanica i procjenu preživljenja stanica nakon kriopohrane za KMS i subpopulacije leukocita, (limfocite T i B, NK stanice i monocite) u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka prikupljenih iz periferne krvi leukaferozom. Nadalje, u tek nekoliko istraživanja vijabilnosti stanica u pripravcima KMS-a iz periferne krvi određivana je kombiniranom 7-AAD/ aneksin V metodom, i to samo u svježim uzorcima (97-99). U odmrznutim kriopohranjenim uzorcima kombinirana metoda s aneksinom V primijenjena je samo u uzorcima krvi iz pupkovine (71, 72, 100, 101).

Pretpostavka je da je 7-AAD/aneksin V metoda osjetljivija za određivanje vijabilnosti stanica u odnosu na standardnu 7-AAD metodu, budući da određuje i stanice u ranoj apoptozi uz stanice u kasnoj apoptozi i nekrozi, te na taj način može dati bolji uvid u vijabilnost i preživljenje stanica nakon kriopohrane. U ovom istraživanju dobivena je statistički značajna razlika za postotke živih stanica određenih 7-AAD/aneksin V metodom i standardnom 7-AAD metodom za KMS i subpopulacije leukocita u svježim i odmrznutim uzorcima alogenih i autolognih pripravaka stanica, s tim da su rezultati dobiveni standardnom 7-AAD metodom bili viši u odnosu na one dobivene kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom. Statistički značajno viši rezultati dobiveni su i za ukupni broj živih stanica 7-AAD metodom, osim za NK stanice u svježim uzorcima alogenih pripravaka, gdje nije nađena statistički značajna razlika. Iako je dobivena statistički značajna razlika i za postotak vijabilnosti i za ukupan broj živih stanica u odmrznutima kriopohranjenim uzorcima, te su rezultati sa 7-AAD metodom bili viši u odnosu na rezultate 7-AAD/aneksin V metodom, dobivene razlike nemaju utjecaj na laboratorijsku procjenu kvalitete pripravaka KMS-a jer su medijani vijabilnosti CD34+ stanica u autologim pripravcima bili 94,9% vs. 93,1%, odnosno 94,5 vs. 92,1% u uzorcima alogenih pripravaka.

Prema preporukama o provođenju kontrole kvalitete transplantata KMS-a, nakon odmrzavanja u kriopohranjenim uzorcima pripravaka prikupljenih leukaferozom vijabilnost stanica s jezgrom (engl. *nucleotid cells*) trebala bi biti > 50 % (48). U provedenom istraživanju zadovoljeni su navedeni kriteriji za sve subpopulacije stanica bez obzira kojom metodom je vijabilnost određivana. Treba naglasiti da je određivanje stanica u ranoj apoptozi kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom protočnom citometrijom tehnički složenije u odnosu na određivanje sa standardnom 7-AAD metodom, jer zahtijeva dodatne reagense, promjenu protokola za analizu stanica, te dodatno znanje za analizu podataka. Također, primjena spomenute metode u rutinskoj procjeni kvalitete transplantata povećava i cijenu same analize, a nema dodatnu vrijednost u odnosu na standardnu 7-AAD metodu.

Preživljenje stanica nakon kriopohrane i odmrzavanja najbolji je pokazatelj utjecaja navedenih procesa na gubitak stanica i smanjenje vijabilnost, jer je preživljenje definirano kao broj živih stanica koje su zadržale svoje osobine nakon kriopohrane (102). U uzorcima autolognih i alogenih pripravaka, statistički značajno niži postotak preživljenja CD34+ stanica dobiven je kada je apsolutni broj živih stanica određivan 7-AAD/aneksin V metodom u usporedbi sa 7-AAD metodom. Medijani postotka preživljenja CD34+ stanica u uzorcima autolognih pripravaka bili su 73,7 % određeni 7-AAD metodom i 72,7 % 7-AAD/aneksin V metodom. Slični rezultati dobiveni su u više neovisnih istraživanja koja su uključivala analizu preživljenja CD34+ stanica u autolognim pripravcima. Desoutter i sur. u svom istraživanju prikazali su medijan preživljenja CD34+ stanica $65,3 \pm 3,9$ % u bolesnika s limfomom i $67,1 \pm 12,8$ % u bolesnika s multiplim mijelomom (103). Nadalje, Varmavuo i sur. u svom istraživanju navode medijan postotka gubitka CD34+ stanica od 24 do 43 % u bolesnika s multiplim mijelomom, a postoci gubitka stanica razlikovali su se ovisno o vrsti mobilizacijskog protokola (104). S druge strane, Félix i sur., te Sartor i sur. u svojim istraživanjima izvještavaju o boljem postotku preživljenja CD34+ stanica u odnosu na preživljenje stanica dobiveno u ovom istraživanju, i u prethodno objavljenim istraživanjima za autologne pripravke KMS-a (Félix i sur.: medijan 94 %, raspon: 73 – 100 %; Sartor i sur.: medijan 93 %, raspon: 48 – 107 %) (105, 106).

Autologni pripravci najčešće se kriopohranjuju odmah nakon završetka prikupljanja stanica, dok se alogeni u pravilu transplantiraju svježi. No da bi se osigurala dostupnost alogenih pripravaka kroz COVID-19 pandemiju, preporuka je takve vrste pripravaka kriopohranjivati u centrima u kojima je predviđena transplantacija KMS-a, iako utjecaj kriopohrane i odmrzavanja na preživljenje stanica u alogenim pripravcima nije bio dovoljno istražen prije pojave pandemije (49). U provedenom istraživanju postotak preživljenja CD34+ stanica u

alogenim pripravcima bio je niži u odnosu na autologne pripravke (medijan preživljenja iznosio je 68,4 % kada je vijabilnost stanica određivana 7-AAD metodom, odnosno 68,1 % 7-AAD/aneksin V metodom). Niže preživljenje alogenih pripravaka može se objasniti utjecajem duljeg vremenskog razdoblja njihove pohrane na temperaturi + 4 °C zbog transporta od centara gdje su prikupljeni do centra u kojem je planirana transplantacija KMS-a. S druge strane, kriopohrana autolognih pripravaka u pravilu započinje neposredno nakon završetka prikupljanja stanica što posljedično smanjuje utjecaj vremena pohrane svježeg pripravka na postotak preživljenja stanica nakon kriopohrane.

U istraživanjima koja su analizirala preživljenje CD34+ stanica u alogenim pripravcima, medijani preživljenja bili su između 71 % i 81 % (90, 107-110). No, ima i oprečnih rezultata, pa tako Wiercinska i sur. u svom istraživanju izvještavaju o medijanu postotka preživljenja CD34+ stanica od 42,2 % (raspon 23,2 % - 92,4 %), dok su Fisher i sur., te Berens i sur. u svojim neovisnim istraživanjima izvijestili o srednjoj vrijednosti postotka preživljenja CD34+ stanica od 93,0 do 98,5 % (50, 79, 81). Prema dostupnim podacima iz prethodno objavljenih kao i iz ovog istraživanja, uočena je razlika u postotku preživljenja CD34+ stanica nakon kriopohrane, odnosno različit učinak kriopohrane na preživljenje KMS-a. Takvi oprečni rezultati mogu se objasniti primjenom različitih protokola za kriopohanu pripravaka u transplantacijskim centrima te primjenom različitih metoda i protokola za obilježavanje stanica i određivanje njihove vijabilnosti (npr. postupanje sa stanicama nakon odmrzavanja, vrsta metode za određivanje vijabilnosti, različite temperature i vremensko razdoblje inkubacije prilikom obilježavanja stanica za analizu protočnom citometrijom). Za procjenu kliničkog ishoda transplantacije KMS-a određuje se apsolutni broj živih CD34+ stanica u odmrznutim kriopohranjenim uzorcima te se analiza živih stanica mora provoditi kao dio rutinske procjene kvalitete procjenom preživljenja KMS-a nakon kriopohrane (111).

Osim određivanja broja živih CD34+ stanica, u procjeni kvalitete transplantata koristi se i CFU test, kojim se procjenjuje proliferacijska sposobnost KMS-a (70). Nedostatak ovog funkcijskog testa je vrijeme izdavanja rezultata (najčešće 14 dana) pa su primjerice rezultati za alogene pripravke obično dostupni nakon što je pripravak KMS-a već transplantiran bolesniku (112). Stoga se javlja potreba za testom čiji rezultati mogu služiti za procjenu kvalitete pripravka KMS-a s kraćim vremenskim periodom izdavanja nalaza. Smatra se da je jedan od takvih testova određivanje stanica u ranoj apoptozi koristeći aneksin V protočnom citometrijom. Medijan postotka preživljenja CFU-GM kolonija dobivenih CFU testom u ovom istraživanju bio je 54,0 %. U objavljenim neovisnim istraživanjima nailazi se na različite rezultate preživljenja kolonija dobivenih CFU testom, u kojima je raspon medijana

preživljenja 31,7 – 66,4 % (74, 102, 113-115). U dosad objavljenim istraživanjima provedenima na krvi iz pupkovine dobivena je dobra povezanost živih CD34+ stanica određenih 7-AAD/aneksin V metodom s rezultatima CFU testa (71, 72). U provedenom istraživanju pronađena je slaba povezanost između postotka preživljenja CD34+ stanica i kolonija dobivenih CFU testom nakon odmrzavanja kriopohranjenih uzoraka pripravaka KMS-a, bez obzira jesu li žive CD34+ stanice određene 7-AAD ili 7-AAD/aneksin V metodom. Pregledom literature nisu pronađena istraživanja koja su ispitivala povezanost preživljenja CD34+ stanica i preživljenja CFU-GM kolonija u pripravcima KMS-a iz periferne krvi. Dosadašnja istraživanja ispitivala su samo povezanost broja živih CD34+ stanica s brojem CFU-GM kolonija, a ne i njihovo preživljenje. Tako su Yang i sur. u svom istraživanju pronašli slabu povezanost između broja živih CD34+ stanica i CFU-GM kolonija ($r = 0,48$, $P=0,0001$), dok je u istraživanju Boulassel i sur. prikazana dobra povezanost između CD34+ stanica/kg i CFU/kg ($r = 0,62$, $P < 0,0001$) (102, 116). Analiza rezultata provedenog istraživanja upućuje na to da su preživljenje i vijabilnosti stanica u odmrznutim kriopohranjenim uzorcima pripravaka, određene metodama na protočnom citometru prihvatljivi za procjenu kvalitete pripravaka KMS-a kada CFU test nije moguće provesti ili je potrebno procijeniti kvalitetu pripravka prije nego što su dostupni rezultati CFU testa (112). Spomenuto je kako se pripravci stanica za staničnu terapiju u današnje vrijeme primjenjuju sve češće kao terapijska opcija u liječenju različitih bolesti, stoga je potrebno istražiti kako kriopohrana utječe na preživljenje subpopulacija leukocita u takvim vrstama pripravaka. U provedenom istraživanju u autolognim pripravcima kriopohrana je najmanje utjecala na preživljenje CD3+/CD8+ stanica dok su monociti (CD14+ stanice) imali najniži postotak preživljenja. I u alogenim pripravcima kriopohrana je najviše utjecala na preživljenje monocita, dok su limfociti B (CD19+ stanice) pokazali najveću otpornost na proces kriopohrane, što je prikazano i u istraživanju Berens i sur., u kojemu su CD19+ stanica imale bolji postotak preživljenja ($98,6 \pm 15,1$ %) u usporedbi s preživljenjem NK stanica i limfocita T (81). Nizak postotak preživljenja limfocita T prikazan je i u istraživanju Fisher i sur., osobito u pripravcima prikupljenima od nesrodnih zdravih davatelja ($66,6 \pm 35,8$ % od nesrodnih davatelja, $90,7 \pm 21,4$ % od srodnih davatelja) (50). Značajan gubitak CD3+ stanica (43 %) u svom istraživanju prikazali su i Fernandez-Sojo i sur. (107). Svi navedeni rezultati iz prethodno objavljenih istraživanja, kao i rezultati ovog istraživanja, upućuju na to da kriopohrana različito utječe na postotak preživljenja pojedinih stanica subpopulacija leukocita. Navedena istraživanja nisu uključivala ispitivanje preživljenja stanica svih subpopulacija leukocita, a nije pronađeno niti jedno istraživanje koje je prikazalo utjecaj

kriopohrane na monocite koji se koriste u staničnoj terapiji dendritičkim stanicama. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja u različitim uvjetima kriopohrane, odmrzavanja, ali i postupaka obilježavanja i analize stanica, kako bi se dobio detaljan uvid u utjecaj kriopohrane na preživljenje svih subpopulacija leukocita u autolognim i alogenim pripravcima stanica prikupljenih leukaferozom. Rezultati takvih istraživanja omogućili bi izradu smjernica, kako što bolje očuvati vijabilnost stanica i osigurati što veći postotak preživljenja nakon kriopohrane u pripravcima za staničnu terapiju.

Osim samog postupka kriopohrane, poznato je da na preživljenje stanica utječu i drugi čimbenici, kao što su obilježja svježeg pripravka (npr. koncentracija leukocita i trombocita, hematokrit, postotak granulocita u pripravku), vrijeme transporta pripravka od davatelja do primatelja, odnosno vrijeme i temperatura pohrane pripravaka prije kriopohrane (29, 77). U provedenom istraživanju analiziran je utjecaj obilježja svježeg pripravka na preživljenje stanica nakon kriopohrane. U autolognim pripravcima vrijeme pohrane svježih pripravaka utjecalo je na preživljenje CD3+/CD8+ stanica bez obzira na to koja je metoda rabljena za određivanje vijabilnosti stanica. Dulje vremensko razdoblje pohrane uzrokovalo je niži postotak preživljenja CD3+/CD8+ stanica nakon kriopohrane (slaba negativna povezanost). Slaba negativna povezanost pronađena je i između koncentracije trombocita u svježim autolognim pripravcima i postotka preživljenja CD3+ stanica kada je vijabilnost stanica određivana 7-AAD metodom te postotka preživljenja CD3+/CD4+ stanica kada je vijabilnost određena 7-AAD/aneksin V metodom. Negativna povezanost ukazuje na to da su više koncentracije trombocita imale jači utjecaj na smanjenje postotka preživljenja CD3+ i CD3+/CD4+ stanica nakon kriopohrane. Koncentracija leukocita (CD45+ stanica) u svježima i odmrznutim kriopohranjenom pripravcima stanica, postotak živih leukocita u svježim pripravcima (CD45+/7-AAD- stanice), hematokrit i postotak granulocita u svježim pripravcima, nisu utjecali na postotak preživljenja stanica nakon kriopohrane u autolognim pripravcima. U ovom istraživanju minimalan utjecaj različitih faktora na preživljenje stanica autolognih pripravaka može se objasniti dobro kontroliranim postupcima prikupljanja stanica leukaferozom (npr. praćenje sloja prikupljanja mononuklearnih stanica s ciljem prikupljanja što manjeg broja neželjenih stanica, odnosno eritrocita, trombocita i granulocita), kao i kontroliranim procesima kriopohrane pripravaka koji započinje u najkraćem mogućem roku od završetka leukaferoze (29). U provedenom istraživanju 76,7 % autolognih pripravaka bilo je kriopohranjeno unutar pet sati od završetka prikupljanja stanica. Pripravci stanica pohranjeni preko noći u kontroliranim uvjetima još su dodatno bili razrijeđeni autolognom plazmom kako koncentracija leukocita u pripravku ne bi iznosila više od $200 \times 10^9/L$, jer

previsoka koncentracija stanica u pripravku može dovesti do gubitka stanica i nastanka ugrušaka nakon odmrzavanja, a može i štetno djelovati na bolesnika tijekom infuzije pripravka (29, 30).

Utjecaj obilježja pripravaka na vijabilnost i preživljenje stanica nakon kriopohrane alogenih pripravaka još nije dovoljno istražen (112). Iako je poznato da prisutnost granulocita u svježim pripravcima utječe na smanjenje preživljenja stanica nakon kriopohrane, u ovom istraživanju pronađen je utjecaj postotka granulocita iz svježih alogenih pripravaka samo na postotak preživljenja CD3+, CD3+/CD8+ i CD3+/CD4+ stanica: viši postotak granulocita imao je jači utjecaj na smanjenje postotka preživljenja ovih stanica (103). Koncentracija leukocita u svježim i odmrznutim kriopohranjenim pripravcima (CD45+ stanica), postotak živih leukocita (CD45+/7-AAD- stanice), hematokrit i koncentracija trombocita u svježim alogenim pripravcima nisu utjecali na smanjenje preživljenja stanica u kriopohranjenim pripravcima nakon odmrzavanja. U dosad objavljenim istraživanjima prikazani su oprečni rezultati u odnosu na rezultate ovog istraživanja, u kojima je dokazan negativan utjecaj koncentracije leukocita na kvalitetu odmrznutog kriopohranjenog uzorka, odnosno na smanjenje postotka preživljenja CD34+ stanica nakon odmrzavanja (32, 117, 118).

Poznato je kako je odmrznute kriopohranjene pripravke stanica uputno infundirati bolesniku u što kraćem vremenskom razdoblju nakon odmrzavanja, kako bi se smanjio potencijalni negativan učinak kriozaštitne otopine na vijabilnost stanica. Preporučeno vrijeme infuzije je maksimalno 10 – 20 minuta od odmrzavanja (48). No postoje situacije u kojima nije moguće infundirati odmrznuti pripravak stanica odmah po odmrzavanju, kao što je pogoršanje općeg stanja bolesnika koji prima pripravak stanica, ili tehnički problemi tijekom transplantacije. Prema JACIE standardima potrebno je i u uzorku uzetome iz vrećice odmrznutog pripravka koji se infundira bolesniku odrediti apsolutni broj i postotak živih stanica, kako bi se dobio točan uvid u kvalitetu pripravaka koji je infundiran bolesniku (51). Takvi uzorci se neposredno nakon uzimanja iz vrećice dostavljaju u laboratorij za analizu stanica. No u nekim slučajevima se takav uzorak ne može odmah dostaviti, te je potrebno ispitati u kojoj mjeri duljina bivanja stanica u kriozaštitnoj otopini u odmrznutima kriopohranjenim uzorcima utječe na njihovu vijabilnost. Nadalje, ispitivanjem kratkotrajne stabilnosti uzorka odmrznutih stanica potrebno je odrediti u kojem vremenskom razdoblju od odmrzavanja te izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini, ne dolazi do značajnog smanjenja broja živih stanica koji bi utjecao na procjenu kvalitete transplantata i je li takav uzorak prihvatljiv za analizu stanica.

Kratkotrajna stabilnost uzoraka svježih pripravaka KMS-a prikupljenih iz periferne krvi ispitivana je u nekoliko neovisnih istraživanja određivanjem vijabilnosti CD34+ stanica kako

bi se odredilo vremensko razdoblje u kojem su uzorci svježeg pripravka stabilni, odnosno u kojem se ne smanjuje vijabilnost stanica tijekom pohrane (21, 59). Nadalje, ispitan je i utjecaj dugotrajne pohrane kriopohranjenih pripravaka KMS-a prikupljenih iz periferne krvi i krvi iz pupkovine u nekoliko neovisnih istraživanja analizom vijabilnost CD34+ stanica (119-121). Takva istraživanja daju uvid u to utječe li vrijeme kriopohrane pripravaka u tekućem dušiku na -196 °C na vijabilnost i preživljenje stanica nakon odmrzavanja. No, samo je u nekoliko istraživanja ispitivana kratkotrajna stabilnost odmrznutih kriopohranjenih pripravaka KMS-a određivanjem vijabilnosti CD34+ stanica u uzorcima krvi iz pupkovine i pripravcima leukaferoze s oprečnim rezultatima koji uključuju različito vremensko razdoblje od odmrzavanja kriopohranjenih uzoraka u kojima nema značajnog smanjenja vijabilnosti CD34+ stanica u odnosu na vijabilnost odmah po odmrzavanju (74, 83-85). Lee i sur. izvijestili su da se vijabilnost CD34+ stanica značajno smanjuje 24 sata nakon odmrzavanja ukoliko su uzorci krvi iz pupkovine bili pohranjeni na sobnoj temperaturi nakon odmrzavanja (84). Oprečno tim rezultatima, Fry i sur. u svom istraživanju ističu da vrijeme prije infuzije značajno utječe na vijabilnost stanica i da su uzorci pripravaka krvi iz pupkovine stabilni do sat vremena nakon odmrzavanja, jer u tom vremenskom razdoblju nije dokazano značajno smanjenje vijabilnosti stanica u uzorcima u kojima nije bilo manipulacije stanicama nakon odmrzavanja (npr. uklanjanje kriozaštitne otopine, ili razrjeđenje uzoraka prije analize) (85). Utjecaj kriozaštitne otopine nakon odmrzavanja ispitali su i Huang i sur., te su zaključili da se vijabilnost KMS-a u pripravcima krvi iz pupkovine ne smanjuje značajno do 30 minuta od odmrzavanja ako su uzorci pohranjeni na sobnoj temperaturi nakon odmrzavanja, s preporukom da je optimalno vremensko razdoblje za infuziju odmrznutih kriopohranjenih pripravaka krvi iz pupkovine do 20 minuta nakon odmrzavanja (83). Yang i sur. ispitali su utjecaj vremena izloženost stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja (analiza svakih 20 minuta tijekom dva sata od odmrzavanja) kao i temperature pohrane stanica (0 °C, 22 °C i 37 °C) na preživljenje CD34+ stanica u autolognim pripravcima KMS-a prikupljenima iz periferne krvi. Rezultati njihovog istraživanja upućuju na to da vremensko razdoblje i temperatura pohrane odmrznutih pripravaka ne utječu na postotak preživljenja stanica nakon odmrzavanja (74).

Utjecaj kriozaštitne otopine, odnosno DMSO-a na vijabilnost stanica ovisi o vrsti stanica, stupnju razvoja i fazi diferencijacije stanica, ali isto tako i o koncentraciji kriozaštitne otopine i vremenu izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja (29). Iako se u nekim centrima prije analize stanica uklanja kriozaštitna otopina, bilo kakva manipulacija stanicama nakon odmrzavanja može utjecati na njihovu vijabilnost i potencijalno smanjiti broj živih

stanica u uzorku (74). Zbog navedenog razloga u provedenom istraživanju nije bilo uklanjanja kriozaštitne otopine u uzorcima pripravaka nakon odmrzavanja, ali i zbog toga što u pripravcima prije infuzije također nije bilo uklanjanja kriozaštitne otopine, tako da su rezultati izmjereni u uzorcima omogućili jasan uvid utjecaja kriopohrane i odmrzavanja na vijabilnost stanica (74). Stoga je preporuka da svaki laboratoriji ispita u vlastitim uvjetima u kojem vremenskom razdoblju od odmrzavanja nema razlike u vijabilnosti ciljanih stanica koja bi utjecala na kvalitetu transplantata zbog različitih protokola za kriopohranu, odmrzavanja i manipulacije stanicama nakon odmrzavanja.

Pregledom dostupnih literaturnih podataka nisu pronađena istraživanja koja su prospektivno ispitivala vrijeme izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja s ciljem određivanja vremenskog razdoblja od odmrzavanja u kojem nema promjene u vijabilnosti KMS-a i subpopulacija leukocita u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka KMS-a prikupljenih leukaferozom.

Rezultati provedenog istraživanja pokazali su da se apsolutni broj živih CD34+, CD19+ i CD14+ stanica značajno smanjuje već sat vremena nakon odmrzavanja, te je kriopohranjene pripravke koji sadrže navedene stanice potrebno transplantirati odmah po odmrzavanju kako bi se očuvala njihova vijabilnost. Stanice najotpornije na utjecaj kriozaštitne otopine bile su limfociti T. Analiza rezultata utjecaja kriozaštitne otopine na limfocite T upućuje da DMSO utječe u manjoj mjeri na žive CD3+/CD4+ stanice u usporedbi sa CD3+/CD8+ stanicama jer je broj živih CD3+/CD4+ stanica značajno smanjen tek tri sata nakon odmrzavanja, u odnosu na broj živih CD3+/CD8+ stanica čiji se broj značajno smanjio sat vremena od odmrzavanja.

Prilikom ispitivanja utjecaja vremenskog razdoblja izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini za određivanje vijabilnosti stanica također su korištene dvije metode, 7-AAD metoda i 7-AAD/ankesin V metoda. Iako je bilo za očekivati da će dulje bivanje stanica u kriozaštitnoj otopini smanjiti vijabilnost stanica, osobito onu određivanu 7-AAD/ankesin V metodom zbog potencijalnog nastanka dodatnih oštećenja stanica karakterističnih za ranu apoptozu, rezultati provedenog istraživanja upućuju na to kako u promatranom vremenskom razdoblju nije bilo razlike u apsolutnom broju živih stanica određivanom dvjema metodama. Može se pretpostaviti da izloženost stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja u promatranom vremenskom razdoblju uzrokuje većinom oštećenja stanica karakteristična za kasnu apoptozu i nekrozu. Nadalje, rezultati upućuju na to da kombinirana metoda s aneksinom V nema dodatnu vrijednost u određivanju vijabilnosti stanica i stabilnosti uzoraka odmrznutih autolognih i alogenih pripravaka u usporedbi sa standardnom 7-AAD metodom u uvjetima u kojima je provedeno ovo istraživanje.

Već je navedeno da u današnje vrijeme većina laboratorija za kontrolu kvalitete transplantata koristi *single-platform* metodu za određivanje apsolutnog broja stanica i ta metoda prihvaćena je kao zlatni standard, sa ciljem da se smanji broj grešaka kod mjerenja i analize stanica (122, 123). *Single platform* metoda u protokolu za analizu živih stanica subpopulacija leukocita uključuje apsolutni broj živih CD45+ stanica, odnosno leukocita, dok se kod *dual platform* metode apsolutni broj živih ciljanih stanica izračunava množenjem postotka živih ciljanih stanica dobiven protočnom citometrijom i koncentracije leukocita izmjerene na hematološkom brojaču, što uključuje sve leukocite a ne samo žive. Apsolutni broj živih stanica koristi se za izračun ukupnog broja stanica u pripravku, bilo da se radi o svježim pripravcima ili odmrznutima kriopohranjenim pripravcima, a služi i za izračun postotka preživljenja stanica nakon kriopohrane; stoga je važno da se apsolutni broj živih stanica točno i precizno odredi. Rezultati provedenog istraživanja upućuju na to da je apsolutni broj živih stanica u procjeni kvalitete pripravka korisniji nego određivanje samo postotka vijabilnosti stanica. Usporedbom rezultata autogenih i alogenih uzoraka pripravaka KMS-a prikupljenih iz periferne krvi, apsolutni broj monocita (CD14+ stanica) i NK stanica (CD16+/CD56+) statistički se značajno razlikovao u sve tri točke mjerenja, bez razlike u postotku živih stanica, što upućuje na to da apsolutni broj živih stanica jasnije odražava učinak kriopohrane i odmrzavanja na stanice u pripravcima prikupljenima iz periferne krvi postupkom leukaferenze. Razlog tome je što neke stanice ne prežive proces kriopohrane i odmrzavanja, odnosno budu lizirane, te se na taj način smanjuje i ukupan broj stanica u uzorcima, a ne samo njihova funkcionalnost, odnosno vijabilnost.

Iz već objavljenih istraživanja poznato je da na vijabilnost i preživljenje CD34+ i CD3+ stanica nakon kriopohrane utječe i vrijeme pohrane svježeg pripravka, odnosno vrijeme između završetka postupka leukaferenze i početka postupka kriopohrane (107). Stoga je bilo za pretpostaviti da će stanice koje su bile pohranjene dulje vrijeme prije kriopohrane imati manji postotak vijabilnosti i slabiju otpornost na dulje vremensko razdoblje izlaganja kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja. U provedeno istraživanje bilo je uključeno 20 alogenih pripravaka KMS-a prikupljenih iz periferne krvi u WMDA centrima, te su bili svježi pohranjeni na temperaturi od + 4 ° C više od 24 sata prije kriopohrane. Stoga je ispitano postoji li razlika u stabilnosti uzoraka alogenih pripravaka koji su prikupljeni i kriopohranjeni za manje od 24 sata u odnosu na uzorke pripravaka koji su bili kriopohranjeni za više od 24 sata od prikupljanja stanica. Rezultati upućuju na to da vrijeme pohrane pripravaka prije kriopohrane nije utjecalo na vijabilnost stanica u uzorcima kriopohranjenih alogenih pripravaka nakon odmrzavanja, jer nije bilo statistički značajne razlike u apsolutnom broju

živih KMS-a i stanica subpopulacija leukocita u promatranom vremenskom razdoblju, osim apsolutnog broja CD3+/CD4+ limfocita T, čija se vijabilnost značajno smanjila tri sata nakon odmrzavanja.

Osim vremenskog razdoblja u kojemu su stanice nakon odmrzavanja izložene kriozaštitnoj otopini, na vijabilnost može utjecati i temperatura inkubacije stanica prilikom obilježavanja za analizu na protočnom citometru. U prethodno objavljenim istraživanjima stanice su inkubirane ili na + 4 °C ili na sobnoj temperaturi (82-84). U ovom istraživanju stanice su bile inkubirane samo na + 4 °C, jer je u slučajnim uzorcima, koji nisu bili dio ovog istraživanja, primijećeno stvaranje ugrušaka kada su uzorci bili inkubirani na sobnoj temperaturi. Takav fenomen zabilježen je i u istraživanju Fitscher i sur, koji su u gotovo svakom uzorku jedan sat od odmrzavanja zabilježili stvaranje ugruška kada su KMS bile inkubirane na sobnoj temperaturi (82).

6. ZAKLJUČCI

U ovom prospektivnom istraživanju prvi puta su u autolognim i alogenim pripravcima stanica prikupljenim iz periferne krvi postupkom leukaferoze određivane žive KMS i subpopulacije leukocita kombiniranom 7-AAD/aneksin V metodom koja omogućuje određivanje stanica u ranoj apoptozi (aneksin V) i onih u kasnoj apoptozi i nekrozi (7-AAD).

Iako je dobivena statistički značajna razlika i za postotak vijabilnosti i za ukupan broj živih stanica određenih 7-AAD/aneksin V i 7-AAD metodom u odmrznutima kriopohranjenim autolognim i alogenim uzorcima, dobivene razlike nemaju utjecaj na laboratorijsku procjenu kvalitete pripravaka KMS-a. Dobivena je slaba povezanost između preživljenja CD34+ stanica i kolonija dobivenih CFU testom, bez obzira na to koja metoda je korištena za određivanje vijabilnosti stanica. Ovi rezultati upućuju kako 7-AAD/aneksin V metoda nema dodatnu vrijednost u procjeni kvalitete pripravaka stanica prikupljenih leukaferozom u odnosu na standardnu 7-AAD metodu.

Analizom utjecaja kriopohrane i ostalih čimbenika na preživljenje odmrznutih stanica dobiveno je da:

- u autolognim pripravcima kriopohrana najmanje utječe na preživljenje CD3+/CD8+ stanica, a u alogenima na limfocite B (CD19+ stanice);
- u autolognim i alogenim pripravcima kriopohrana najviše utječe na preživljenje CD34+ stanica, a kod subpopulacija leukocita kriopohrana najviše utječe na preživljenje CD14+ stanica;
- kod autolognih pripravaka duže vremensko razdoblje pohrane svježih pripravaka uzrokuje niži postotak preživljenja CD3+/CD8+ stanica nakon kriopohrane; viša koncentracija trombocita u svježim pripravcima uzrokuje smanjenje postotka preživljenja CD3+ stanica kada je vijabilnost stanica određivana 7-AAD metodom te postotka preživljenja CD3+/CD4+ stanica kada je vijabilnost određivana 7-AAD/aneksin V metodom;
- prisutnost granulocita u svježim alogenim pripravcima utječe na smanjenje postotka preživljenja limfocita T;
- koncentracija leukocita u svježim i odmrznutim kriopohranjenim pripravcima (CD45+ stanica), postotak živih leukocita (CD45+/7-AAD- stanice) i hematokrit u svježim pripravcima ne utječu na smanjenje postotka preživljenja stanica u uzorcima kriopohranjenih autolgnih i alogenih pripravka nakon odmrzavanja.

U ovom istraživanju minimalan utjecaj različitih čimbenika na preživljenje stanica može se objasniti dobro kontroliranim postupcima prikupljanja stanica leukaferozom, kao i kontroliranim procesom kriopohrane pripravaka koji započinje u najkraćem mogućem roku od završetka leukaferoze, osobito za autologne pripravke i alogene pripravke prikupljane u transplantacijskom centru gdje je provedeno istraživanje.

Rezultati analize utjecaja vremena izloženosti stanica kriozaštitnoj otopini nakon odmrzavanja pokazali su:

- da se apsolutni broj živih KMS-a (CD34+ stanica), limfocita B (CD19+ stanica) i monocita (CD14+ stanica) značajno smanjuje već sat vremena od odmrzavanja te je kriopohranjene pripravke koji sadrže navedene stanice potrebno transplantirati odmah po odmrzavanju kako bi se očuvala vijabilnost stanica;
- da se apsolutni broj živih monocita (CD14+ stanica) i NK stanica (CD16+/CD56+) statistički značajno razlikuje u sve tri točke mjerenja u uzorcima autoložnih i alogenih pripravaka;
- da vrijeme pohrane svježih alogenih pripravaka utječe samo na apsolutni broj živih CD3+/CD4+ stanica tri sata nakon odmrzavanja; rezultati postotka živih CD14+ i CD16+/56+ stanica statistički se značajno razlikuju odmah nakon odmrzavanja ovisno o vremenu pohrane nakon prikupljanja, odnosno za CD16+/56+ stanica i sat vremena nakon odmrzavanja; za subpopulacije limfocita T statistički značajna razlika nađena je za rezultate postotka živih stanica u svim vremenskim točkama.

Apsolutni broj živih stanica točnije odražava učinak kriopohrane i odmrzavanja na stanice u pripravcima prikupljenim iz periferne krvi nego postotak živih stanica. Koristi se u izračunu ukupnog broja živih stanica u pripravcima i za izračun postotka preživljenja stanica nakon kriopohrane, što je najvažniji parametar za procjenu kvalitete kriopohranjenog pripravka.

Pridržavanje preporuka postupanja s pripravcima KMS-a, kao što je razrjeđenje pripravaka leukaferoze plazmom u slučaju odgođene kriopohrane i smanjenje vremena pohrane svježih pripravaka, kao i infuzija pripravaka odmah nakon odmrzavanja, može utjecati na očuvanje vijabilnosti stanica i pridonijeti višem postotku preživljenja stanica nakon kriopohrane. Ukoliko su procesi prikupljanja stanica, kriopohrane i odmrzavanja jasno definirani i nadzirani, smanjit će se njihov negativan utjecaj na preživljenje stanica nakon odmrzavanja. Kako su u ovom istraživanju zapaženi različiti postoci preživljenja subpopulacija leukocita u

pripravcima nakon kriopohrane, preporuka je da transplantacijski centri ispitaju utjecaj kriopohrane i ostalih čimbenika na preživljenje ciljanih stanica u vlastitim uvjetima.

7. POPIS LITERATURE

1. Okeke C, Silas U, Okeke C, Chikwendu C. Current Trends on Hemopoietic Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;16:199-208.
2. Thomas ED, Lochte HL JR, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257:491-6.
3. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Wisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cell. *Exp Hematol.* 1986;14:192-6.
4. Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood.* 1986;67:529-32.
5. Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Löffler H, Schmitz N, Schroyens W. Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood.* 1993;81:1404-7.
6. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, i sur. 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;321:1174-8.
7. Poliwoda S, Noor N, Downs E, Schaaf A, Cantwell A, Ganti L, i sur. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthop Rev.* 2022;14:37498.
8. Simpson E, Dazzi F. Bone Marrow Transplantation 1957-2019. *Front Immunol.* 2019;10:1246.
9. Giralt S, Costa L, Schriber J, Dipersio J, Maziarz R, McCarty J i sur. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:295–308.
10. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR i sur. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2012;367:1487–96.
11. Chang HH, Liou YS, Sun DS. Hematopoietic stem cell mobilization. *Tzu Chi Med J.* 2021;34:270-75.

12. Mohty M, Ho AD. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2011;39:723-9.
13. Balassa K, Danby R, Rocha V. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. *Br J Hosp Med.* 2019;80:33-9.
14. Bojanić I, Mazić S, Cepulić BG. Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi. *Lijec Vjesn.* 2009;131:315-23.
15. Mukherjee S, Reddy O, Panch S, Stroncek D. Establishment of a cell processing laboratory to support hematopoietic stem cell transplantation and chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy. *Transfus Apher Sci.* 2021;60:103066.
16. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell.* 2020;11:34-44.
17. Caocci G, Greco M, La Nasa G. Bone Marrow Homing and Engraftment Defects of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9 e2017032.
18. To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood.* 2011;118:4530-40.
19. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87:1-13.
20. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001;15:1-13.
21. Rimac V, Bojanić I, Gojčeta K, Golubić Čepulić B. Evaluation of the BD Stem Cell Enumeration Kit on the BD FACSCanto II flow cytometer using bd facscanto clinical and bd facsdiva software. *Int J Lab Hematol.* 2021;43:61-7.
22. Preti RA, Chan WS, Kurtzberg J, Dornsife RE, Wallace PK, Furlage R i sur. Multi-site evaluation of the BD Stem Cell Enumeration Kit for CD34+ cell enumeration on the BD FACSCanto II and BD FACSCalibur flow cytometers. *Cytotherapy.* 2014;16:1558-74.
23. Sutherland DR, Nayyar R, Acton E, Giftakis A, Dean S, Mosiman VL. Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers. *Cytotherapy.* 2009;11:595-605.
24. Couban S, Aljurf M, Lachance S, Walker I, Toze C, Rubinger R i sur. Filgrastim-stimulated bone marrow compared with filgrastim mobilized peripheral blood in myeloablative sibling allografting for patients with hematologic malignancies: a

- randomized Canadian Blood and Marrow Transplant Group Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:1410–5.
25. Hübel K: Mobilization and collection of HSC. U: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, urednici. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer Open, 2019:117-122.
 26. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA i sur. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201:1307-18.
 27. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem*. 2006;99:690-705.
 28. Turunen A, Silvennoinen R, Partanen A, Valtola J, Siitonen T, Putkonen M, i sur. Autograft cellular composition and outcome in myeloma patients: Results of the prospective multicenter GOA study. *Transfusion*. 2021;6:1830-44.
 29. Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother*. 2019;46:188-96.
 30. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood*. 1994;83:2731–6.
 31. Bojanic I, Dubravcic K, Batinic D, Golubic Cepulic B, Mazic S, Hren D, i sur. Large volume leukapheresis: Efficacy and safety of processing patient's total blood volume six times. *Trans Apheres Sci*. 2011;44:139-47.
 32. Mohammed RN, Ahmad D, Khoshnaw N, Hassan DO, Abdulrahman HA, Vacca M, i sur. Leukapheresis cell concentration adjustment required for a successful recovery of HSC after cryopreservation. *Cryobiology*. 2020;92:21-5.
 33. Jansen EM, Hanks SG, Terry C, Akard LP, Thompson JM, Dugan MJ, i sur. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion*. 2007;47:817-23.
 34. Xu ZL, Huang XJ. Optimizing allogeneic grafts in hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10:S41-S47.
 35. Junghans RP, Ma Q, Rathore R, Gomes EM, Bais AJ, Lo AS i sur. Phase I Trial of Anti-PSMA Designer CAR-T Cells in Prostate Cancer: Possible Role for Interacting

- Interleukin 2-T Cell Pharmacodynamics as a Determinant of Clinical Response. *Prostate*. 2016;76:1257-70.
36. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*. 2018;9:282.
 37. Szmania S, Lapteva N, Garg T, Greenway A, Lingo J, Nair B i sur. Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J Immunother*. 2015;38:24-36.
 38. Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, Sehgal A, Im A, Hou JZ i sur. Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*. 2017;19:1225-32.
 39. Li R, Johnson R, Yu G, McKenna DH, Hubel A. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cytotherapy*. 2019;21:943-57.
 40. Worsham DN, Reems JA, Szczepiorkowski ZM, McKenna DH, Leemhuis T, Mathew AJ, i sur; Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative Group. Clinical methods of cryopreservation for donor lymphocyte infusions vary in their ability to preserve functional T-cell subpopulations. *Transfusion*. 2017;57:1555-65.
 41. Castagna L, Sarina B, Bramanti S, Perseghin P, Mariotti J, Morabito L. Donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2016;54:345-55.
 42. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemey A, Hégo F i sur. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100:218-24.
 43. Panch SR, Srivastava SK, Elavia N, McManus A, Liu S, Jin P i sur. Effect of Cryopreservation on Autologous Chimeric Antigen Receptor T Cell Characteristics. *Mol Ther*. 2019;27:1275-85.
 44. Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monge J, Santos S, Vesga MA, Maruri N i sur. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol*. 2014;5:439.
 45. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013;10: 230-52.
 46. Koepsell SA, Miller JS, McKenna DH Jr. Natural killer cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion*. 2013;53:404-10.
 47. Fang F, Xiao W, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol*. 2017;31:37-54.

48. Wuchter P: Processing, Cryopreserving and Controlling the Quality of HSCs. U: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, urednici. The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Cham: Springer Open, 2019:127-30.
49. Coronavirus Disease Covid-19: EBMT Recommendations Version 17. Dostupno na: <https://www.ebmt.org/covid-19-and-bmt>. Datum pristupa: 27.02.2023.
50. Fisher V, Khuu H, David-Ocampo V, Byrne K, Pavletic S, Bishop M. i sur. Analysis of the recovery of cryopreserved and thawed CD34+ and CD3+ cells collected for hematopoietic transplantation. *Transfusion*. 2014; 54:1088-92.
51. FACT-JACIE International Standards for hematopoietic cellular therapy. Product collection, processing, and administration. Seventh edition. Dostupno na: www.ebmt.org/jacie-standards. Datum pristupa: 27.02.2023.
52. Sakashita AM, Kondo AT, Yokoyama APH, Lira SMC, Bub CB, Souza AM i sur. The impact of preapheresis white blood cell count on autologous peripheral blood stem cell collection efficiency and HSC infusion side effect rate. *J Clin Apher*. 2018;33:331-41.
53. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. HSC transplantation with cryopreserved grafts adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal prior to infusion. *Bone marrow transplant*. 2014;49:469-76.
54. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J i sur. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med*. 2020;15:1463-91.
55. Mitrus I, Smagur A, Fidyk W, Czech M, Prokop M, Chwieduk A i sur. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53:274-80.
56. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL i sur. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol*. 2021;19:56.
57. Rohner N, Passweg JR, Tsakiris DA, Halter JP, Heim D, Buser AS i sur. The value of the post-thaw CD34+ count with and without DMSO removal in the setting of autologous stem cell transplantation. *Transfusion*. 2019;59:1052-60.
58. International Organization for Standardization (ISO). EN ISO 15189 - Medical laboratories - Requirements for quality and competence, 4. izdanje. Ženeva, Švicarska: ISO; 2022.

59. Omana-Zapata I, Oreizy F, Mosqueda F, Salemenik M, Lin A, Wen JL i sur. Performance of a novel BD stem cell enumeration kit on two flow cytometry systems. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:393-9.
60. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*. 1996;5:213-26.
61. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M i sur. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82:9-17.
62. Rimac V, Bojanić I. Role of flow cytometry in evaluation of the cellular therapy products used in haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol*. 2022;44:446-53.
63. Murugesan M, Nair CK, Nayanar SK, Pentapati KC. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: a comparison between single- versus dual-platform methodology using the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol. *Asian J Transfus Sci*. 2019;13:43-6.
64. Mfarrej B, Gaude J, Couquiaud J, Calmels B, Chabannon C, Lemarie C. Validation of a flow cytometry-based method to quantify viable lymphocyte subtypes in fresh and cryopreserved hematopoietic cellular products. *Cytotherapy*. 2021;23:77-87.
65. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111: A3.B.1-A3.B.3.
66. Lemos NE, Farias MG, Kubaski F, Scotti L, Onsten TGH, Brondani LA i sur. Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018;40:213–18.
67. Liu T, Zhu W, Yang X, Chen L, Yang R, Hua Z i sur. Detection of apoptosis based on the interaction between annexin V and phosphatidylserine. *Anal Chem*. 2009;81:2410-3.
68. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*. 2022;27:482-508.
69. Lu J, Le Brun AP, Chow SH, Shiota T, Wang B, Lin TW i sur. Defining the structural characteristics of annexin V binding to a mimetic apoptotic membrane. *Eur Biophys J*. 2015;44:697-708.

70. Škifić M, Golemović M. Colony-forming unit assay as a potency test for hematopoietic stem/progenitor cell products. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*. 2019;2:51-6.
71. Radke TF, Barbosa D, Duggleby RC, Saccardi R, Querol S, Kögler G. The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Appliance of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays. *Stem Cells Int*. 2013; 2013:823912.
72. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB i sur. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion*. 2012;52:549-59.
73. Méry B, Guy JB, Vallard A, Espenel S, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C i sur. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death*; 2017;10:1179670717691251.
74. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, McGann LE. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:1021–6.
75. Lioznov M, Dellbrügger C, Sputtek A, Fehse B, Kröger N, Zander AR. Transportation and cryopreservation may impair haematopoietic stem cell function and engraftment of allogeneic PBSCs, but not BM. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42:121–8.
76. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M i sur. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:967–72.
77. Castelhana MV, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA i sur. Quantifying loss of CD34+ cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfus Apher Sci*. 2013;48:241–6.
78. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, Loach D, Wright J, Gupta V i sur. Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1233–43.
79. Wiercinska E, Schlipfenbacher V, Bug G, Bader P, Verbeek M, Seifried E i sur. Allogeneic transplant procurement in the times of COVID-19: Quality report from the central European cryopreservation site. *J Transl Med*. 2021;19:145.
80. Bankova AK, Caveney J, Yao B, Ramos TL, Bögeholz J, Heydari K i sur. Real-World Experience of Cryopreserved Allogeneic Hematopoietic Grafts during the COVID-19 Pandemic: A Single-Center Report. *Transplant Cell Ther*. 2022;28: 215.e1-215.e10.

81. Berens C, Heine A, Müller J, Held SA, Mayer K, Brossart P i sur. Variable resistance to freezing and thawing of CD34-positive stem cells and lymphocyte subpopulations in leukapheresis products. *Cytotherapy*. 2016;18:1325-31.
82. Fritsch G, Frank N, Dmytrus J, Frech C, Pichler H, Witt V i sur. Relevance of flow cytometric enumeration of post-thaw leucocytes: influence of temperature during cell staining on viable cell recovery. *Vox Sang*. 2016;111:187-96.
83. Huang L, Song GQ, Wu Y, Wang J, Sun ZM. Optimal length of time of cryopreserved umbilical cord blood infusion after thawing. *Hematology*. 2014;19:73-9.
84. Lee YH, Koh H, Nam E, Kim YJ. Cryopreserved cord blood mononuclear cells in DMSO are healthy for at least 6 hours after thawing. *Transfus Apher Sci*. 2019;59:102603.
85. Fry LJ, Querol S, Gomez SG, McArdle S, Rees R, Madrigal JA. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang*. 2015;109:181-90.
86. Worel N, Buser A, Greinix HT, Hägglund H, Navarro W, Pulsipher MA i sur. Suitability Criteria for Adult Related Donors: A Consensus Statement from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Standing Committee on Donor Issues. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2052-60.
87. Lown RN, Philippe J, Navarro W, van Walraven SM, Philips-Johnson L, Fechter M i sur. Unrelated adult stem cell donor medical suitability: recommendations from the World Marrow Donor Association Clinical Working Group Committee. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:880-6.
88. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy*. 2003;5:55-65.
89. Udovicic M, Bazdaric K, Bilic-Zulle L, Petroveckii M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Med*. 2007;17:10-5.
90. Purtill D, Antonenas V, Chiappini P, Tong D, O'Flaherty E, Bajel A i sur. Variable CD34+ recovery of cryopreserved allogeneic HPC products: transplant implications during the COVID-19 pandemic. *Blood Adv*. 2020;4:4147-50.
91. Collins NH, Gee AP, Durett AG, Kan F, Zhang MJ, Champlin RE i sur. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:253-62.

92. Valtola J, Varmavuo V, Ropponen A, Nihtinen A, Partanen A, Vasala K i sur. Blood graft cellular composition and posttransplant recovery in non-Hodgkin's lymphoma patients mobilized with or without plerixafor: a prospective comparison. *Transfusion*. 2015;55:2358-68.
93. Turunen A, Partanen A, Valtola J, Ropponen A, Siitonen T, Kuittinen O i sur. CD34+ cell mobilization, blood graft composition, and posttransplant recovery in myeloma patients compared to non-Hodgkin's lymphoma patients: results of the prospective multicenter GOA study. *Transfusion*. 2020;60:1519-28.
94. Anu P, Antti T, Raija S, Marja P, Jaakko V, Timo S i sur. Comparison of CD34+ cell mobilization, blood graft cellular composition, and post-transplant outcome in myeloma patients mobilized with filgrastim or pegfilgrastim added to low-dose cyclophosphamide: A prospective multicenter study. *Transfusion*. 2021;61:3202-12.
95. Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, Schjødt K, Heilmann C, Vindeløv L i sur. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:1073-82.
96. Varan HD, Bay M, Ozturk A, Dalva K, İlhan O. Comparison of the methods evaluating post thawing viability of peripheral blood stem cell graft. *Transfus Apher Sci*. 2019;58:192-5.
97. Anthony RS, McKelvie ND, Cunningham AJ, Craig JI, Rogers SY, Parker AC. Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21:441-6.
98. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud Ø, Gjertsen BT. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:165-71.
99. Wang T, Remberger M, Björklund A, Watz E. The impact of transportation time on apoptosis in allogeneic stem cell grafts and the clinical outcome in malignant patients with unrelated donors. *Cytotherapy*. 2022;24:508-15.
100. Kim KM, Huh JY, Hong SS, Kang MS. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion*. 2015;55:2017-22.
101. Guttridge MG, Soh TG, Belfield H, Sidders C, Watt SM. Storage time affectis umbilical cord blood viability. *Transfusion*. 2014;54:1278-85.

102. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:881-7.
103. Desoutter J, Ossart C, Lacassagne MN, Regnier A, Marolleau JP, Harrivel V. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy.* 2019;21:612-8.
104. Varmavuo V, Mäntymaa P, Silvennoinen R, Nousiainen T, Kuittinen T, Jantunen E. CD34+ cell subclasses and lymphocyte subsets in blood grafts collected after various mobilization methods in myeloma patients. *Transfusion.* 2013;53:1024-32.
105. Félix OMWO, Tunes G, Ginani VC, Simões PC, Barros DP, Delbuono E i sur. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018;40:233-9.
106. Sartor M, Antonenas V, Garvin F, Webb M, Bradstock KF. Recovery of viable CD34+ cells from cryopreserved hemopoietic progenitor cell products. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:199-204.
107. Fernandez-Sojo J, Horton R, Cid J, Azqueta C, Garcia-Buendia A, Valdivia E i sur. Leukocytapheresis variables and transit time for allogeneic cryopreserved hpc: better safe than sorry. *Bone Marrow Transplant.* 2022;57:1531-8.
108. Mfarrej B, Lemarié C, Granata A, Pagliardini T, Malenfant C, Lignée P. Related versus unrelated allogeneic HPC graft cryopreservation: a single-center experience in the context of the global COVID-19 pandemic. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56:2013-5.
109. Purtill D, Hutchins C, Kennedy G, McClean A, Fraser C, Shaw PJ i sur. Good Engraftment but Quality and Donor Concerns for Cryopreserved Hemopoietic Progenitor Cell Products Collected During the COVID-19 Pandemic. *Transplant Cell Ther.* 2021;27:1022.e1-1022.e6.
110. Fernandez-Sojo J, Azqueta C, Valdivia E, Martorell L, Medina-Boronat L, Martínez-Llonch N i sur. Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic? *Bone Marrow Transplant.* 2021;56:2489-96.

111. Lanza F, Saccardi R, Seghatchian J. New horizons on stem cell cryopreservation through the artificial eyes of CD 34+, using modern flow cytometry tools. *Transfus Apher Sci.* 2020;59:102785.
112. Haematopoietic progenitor cells from bone marrow and peripheral blood. U: Doerr P, urednik. *The Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application.* European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Strasbourg. Vijeće Europe. 2022: 279-302.
113. Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, Troff C, Hiddemann W, Köhler M, i sur. Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion.* 1997;37:1050-7.
114. Alencar S, Garnica M, Luiz RR, Nogueira CM, Borojevic R, Maiolino A, i sur. Cryopreservation of peripheral blood stem cell: the influence of cell concentration on cellular and hematopoietic recovery. *Transfusion.* 2010;50:2402-12.
115. Decot V, Alla F, Latger-Cannard V, Visanica S, Witz B, Stoltz JF, i sur. Thawed autologous peripheral blood stem cells require modified quantification methods for hematopoietic progenitor cell evaluation. *Biomed Mater Eng.* 2012;22:57-67.
116. Boulassel MR. Associations among white blood cells, CD34+ cells and GM-CFU in predicting the optimal timing of peripheral blood stem cell collections by apheresis. *J Assoc Physicians India.* 2008;56:96-8.
117. Watz E, Remberger M, Ringden O, Ljungman P, Sundin M, Mattsson J, i sur. Quality of the hematopoietic stem cell graft affects the clinical outcome of allogeneic stem cell transplantation. *Transfusion.* 2015;55:2339-50.
118. Araújo AB, Salton GD, Angeli MH, Furlan JM, Schmalfuss T, Röhsig LM. Effects of cell concentration, time of fresh storage, and cryopreservation on peripheral blood stem cells: PBSC fresh storage and cryopreservation. *Transfus Apher Sci.* 2022;61:103298.
119. Kubiak A, Matuszak P, Bembnista E, Kozłowska-Skrzypczak M. Banking of Hematopoietic Stem Cells: Influence of Storage Time on Their Quality Parameters. *Transplant Proc.* 2016;48:1806-9.
120. Underwood J, Rahim M, West C, Britton R, Skipworth E, Graves V i sur. How old is too old? In vivo engraftment of human peripheral blood stem cells cryopreserved for up to 18 years - implications for clinical transplantation and stability programs. *World J Stem Cells.* 2020;12:359-67.

121. Dimas-González J, Nieto-Linares A, Millán-Rocha M, Salazar-Bailón JL, Lorenzo-Moreno BA, Rojo-Medina J. Thawing methods do not affect cell viability of CD45+ and CD34+ cells, but long-term cryopreservation of umbilical cord blood units generally decreases cell viability. *Transfus Apher Sci.* 2019;58:196-200.
122. Pedrosa de Lira de Morais CC, Dias Alves Pinto J, Wagner de Souza K, Izu M, Fernando da Silva Bouzas L, Henrique Paraguassú-Braga F. Validation of the single-platform ISHAGE protocol for enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells in umbilical cord blood in a Brazilian center. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44:49-55.
123. Noulsri E, Abudaya D, Lerdwana S, Pattanapanyasat K. Corrected Lymphocyte Percentages Reduce the Differences in Absolute CD4+ T Lymphocyte Counts between Dual-Platform and Single-Platform Flow Cytometric Approaches. *Lab Med.* 2018;49:246-53.

8. ŽIVOTOPIS

Vladimira Rimac (rođena Kutnjak) rođena je 26.12.1985. u Čakovcu. Osnovnu školu i opću gimnaziju pohađala je u Ivancu.

Studij Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2004. godine a diplomirala 2009. godine i stekla titulu magistre medicinske biokemije. 2009. godine dobila je Rektorovu nagradu za rad pod nazivom "Točnost hematološke analize krvi iz pupkovine". Pripravnički staž obavila je u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Opće bolnice Varaždin te položila stručni ispit za magistre medicinske biokemije 2010. godine.

Od travnja 2011. radi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, prvo kao specijalizant, a od 2015. kao specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, gdje radi i danas, u Odjelu za kontrolu kvalitete tkiva i stanica. Područje rada i interesa su joj kontrola kvalitete pripravaka krvotvornih matičnih stanica i pripravaka za staničnu terapiju, te poslijeanalitička faza laboratorijskog rada.

Od 2021. godine sudjeluje u održavanju nastave na studiju Medicinsko-laboratorijska dijagnostika Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu na kolegiju Transfuzijska medicina. Od 2023. godine sudjeluje kao vanjski suradnik u izvođenju nastave na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu na kolegiju Transfuzija s imunohematologijom.

Sudjelovala je kao predavač na više stručnih i znanstvenih skupova te tečajeva trajnog usavršavanja iz područja medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Objavila je 17 znanstvenih i stručnih radova, od kojih je za 9 prvi autor, te 24 posterska sažetka i dva poglavlja u priručnicima.

Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, u kojem je aktivan član Radne grupe za poslijeanalitiku.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Web of Science Core Collection:

1. **Rimac V**, Bojanić I, Dabelić S, Čepulić BG. The impact of cryoprotectant exposure time on post-thaw viability of autologous and allogeneic hematopoietic stem cells and leukocyte subpopulations. *Acta Pharm.* – *Published online September 4, 2023*
2. **Rimac V**, Bojanić I, Dabelić S, Čepulić BG. Variable recovery of cryopreserved hematopoietic stem cells and leukocyte subpopulations in leukapheresis products. *Transfus Apher Sci.* 2023:103763.
3. **Rimac V**, Bojanić I. Role of flow cytometry in evaluation of the cellular therapy products used in haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol.* 2022; 44:446-53.
4. Grgić Medić M, Tomac G, **Rimac V**, Zibar Tomšić K, Kraljević I, Boban A. Fatal intracranial hemorrhage in patient with thrombocytopenia and positive HIT antibodies after vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 - VITT without thrombosis? *Thromb Res.* 2022; 215:55-7.
5. **Rimac V**, Podolar S, Jokić A, Vlastic Tanasković J, Honović L, Leniček Krleža J. Interpretative comments - need for harmonization? Results of the Croatian survey by the Working Group for Post-analytics. *Biochem Med.* 2022;32:010901.
6. Jokić A, **Rimac V**, Vlastic Tanaskovic J, Podolar S, Honovic L, Lenicek Krleza J. The concurrence of the current postanalytical phase management with the national recommendations: a survey of the Working Group for Postanalytics of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med.* 2021; 31:030704.
7. **Rimac V**, Bojanić I, Gojčeta K, Golubić Čepulić B. Evaluation of the BD Stem Cell Enumeration Kit on the BD FACSCanto II flow cytometer using bd facscanto clinical and bd facsdiva software. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2020:1-7.
8. **Rimac V**, Jokić A, Podolar S, Vlašić Tanasković J, Honović L, Leniček Krleža J. General position of Croatian medical biochemistry laboratories on autovalidation: survey of the Working Group for Post-analytics of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochemia medica.* 2020;30:1-8.

9. Leniček Krleža J, Honović L, Vlašić Tanasković J, Podolar S, **Rimac V**, Jokić A. Post-analytical Laboratory Work: National Recommendations From the Working Group for Post-analyticals on Behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochemia Medica*. 2019;29:1-34.
10. Mlinarić A, Miloš M, Coen Herak D, Fuček M, **Rimac V**, Zadro R, Rogić D. Autovalidation and automation of the postanalytical phase of routine hematology and coagulation analyses in a university hospital laboratory. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2018;6:454-62.
11. **Rimac V**, Lapić I, Kuleš K, Rogić D, Miler M. Implementation of the Autovalidation Algorithm for Clinical Chemistry Testing in the Laboratory Information System. *Laboratory medicine*. 2017;46: 284-91.
12. **Rimac V**, Coen Herak D. Is it acceptable to use coagulation plasma samples stored at room temperature and 4°C for 24 hours for additional prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, antithrombin, and D-dimer testing? *International journal of laboratory hematology*. 2017;39:475-81.

Radovi objavljeni u ostalim časopisima:

1. Novoselac J, Buzina Marić K, **Rimac V**, Selak I, Raos M, Golubić Čepulić B. Significance of immunohematologic testing in mother and newborn ABO incompatibility. *Immunohematology*. 2023; 39:55-60.
2. Golubić Čepulić B, Novoselac J, Pavičić Bošnjak A, Leskovar I, Gojčeta K, **Rimac V**. Banka humanog mlijeka u Hrvatskoj: prva iskustva. *Paediatrica Croatica*. 2020;64:103-10.
3. Lapić I, **Rimac V**. Velika očekivanja od biokemijskih biljega. *Farmaceutski glasnik*. 2019;75:93-101.
4. **Rimac V**. Procalcitonin - potential, limitations and availability. *Signa Vitae*. 2015;10: 84-6.
5. Petlevski R, **Kutnjak V**. Oksidativni stres u šećernoj bolesti. *Farmaceutski glasnik*. 2015;71:303-8.

Poglavlja u priručnicima:

1. **V. Rimac.** Refleksno i reflektivno testiranje. U: Leniček Krleža J, urednica. Poslijeanalitička faza laboratorijskog rada: Primjena nacionalnih preporuka u svakodnevnom radu. Zagreb: Medicinska naklada, 2022: 29 – 34.
2. **V. Rimac.** Postupak implementacije autovalidacije. U: Fuček M, Baršić I, urednice. Laboratorij i informatizacija – gdje smo danas?. Zagreb: Medicinska naklada, 2016: 31 – 36.

PRILOG

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada autorice iz teme ove doktorske disertacije, a koji su indeksirani u bazi *Web of Science Core Collection*:

1. **Rimac V**, Bojanić I, Dabelić S, Čepulić BG. Variable recovery of cryopreserved hematopoietic stem cells and leukocyte subpopulations in leukapheresis products. *Transfus Apher Sci.* 2023:103763.

2. **Rimac V**, Bojanić I, Dabelić S, Čepulić BG. The impact of cryoprotectant exposure time on post-thaw viability of autologous and allogeneic hematopoietic stem cells and leukocyte subpopulations. *Acta Pharm.* – *Published online September 4, 2023*

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

UČINAK KRIPOHRANE NA PREŽIVLJENJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA I SUBPOPULACIJA LEUKOCITA PRIKUPLJENIH IZ PERIFERNE KRVI POSTUPKOM LEUKAFEREZE

Vladimira Rimac

SAŽETAK

Zbog očekivanog daljnjeg razvitka i primjene pripravaka za staničnu terapiju, potrebno je poznavati čimbenike koji utječu na vijabilnost i preživljenje stanica nakon kriopohrane. Cilj ovog prospektivnog istraživanja bio je u uzorcima autolognih i alogenih pripravaka stanica prikupljenih iz periferne krvi leukaferozom odrediti broj živih krvotvornih matičnih stanica (KMS) i subpopulacija leukocita 7-amino aktinomycin D (7-AAD)/aneksin V metodom i standardnom 7-AAD metodom te ispitati utjecaj kriopohrane i različitih čimbenika na preživljenje odmrznutih stanica, a i vremensko razdoblje od odmrzavanja koje je prihvatljivo za određivanje vijabilnosti stanica u svrhu procjene kvalitete pripravaka stanica. U 30 autolognih i 30 alogenih uzoraka pripravaka stanica „single-platform“ metodom određen je broj živih KMS-a, limfocita T i B, NK stanica i monocita. Stabilnost odmrznutih uzoraka ispitana je u tri točke: odmah po odmrzavanju te sat vremena i tri sata nakon odmrzavanja. Vijabilnosti svih populacija stanica određene 7-AAD/aneksin V metodom bile su statistički značajno niže u odnosu na 7-AAD metodu u svježim i odmrznutim uzorcima autolognih i alogenih pripravaka, no dobivene razlike nemaju utjecaj na laboratorijsku procjenu kvalitete pripravaka KMS. U autolognim pripravcima kriopohrana najmanje utječe na preživljenje CD3+/CD8+ stanica, a u alogenima na limfocite B (CD19+ stanice). U autolognim i alogenim pripravcima kriopohrana najviše utječe na postotak preživljenja CD34+ stanica, a kod subpopulacija leukocita na preživljenje monocita (CD14+ stanica) i u autolognim i alogenim pripravcima. U autolognim pripravcima na preživljenje CD3+ i CD3+/CD4+ stanica negativno je utjecala viša koncentracija trombocita, a na preživljenje CD3+/CD8+ stanica duljina pohrane svježeg pripravka prije kriopohrane. U alogenim pripravcima postotak granulocita negativno je utjecao na preživljenje limfocita T.

Ispitivanjem utjecaja kriozaštitne otopine na vijabilnost stanica nakon odmrzavanja dobiveno je da se apsolutni broj živih KMS-a, limfocita B i monocita statistički značajno smanjuje već sat vremena od odmrzavanja te je priprema s tim vrstama stanice potrebno transplantirati odmah po odmrzavanju.

U ovom istraživanju zapaženo je različito preživljenje KMS-a i subpopulacija leukocita nakon kriopohrane. Stoga bi svaki transplantacijski centar trebao u svojim uvjetima ispitati kako kriozaštitna otopina i ostali čimbenici utječu na vijabilnost i preživljenje stanica od interesa.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 103 stranice, 15 grafičkih prikaza, 13 tablica i 123 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: stanična terapija, krvotvorne matične stanice, subpopulacije leukocita, kriopohrana, preživljenje stanica

Mentori: Dr. sc. Ines Bojanić, docent
Dr. sc. Sanja Dabelić, redoviti profesor

Ocjenjivači: Dr. sc. Marija Grdić Rajković, izvanredni profesor
Dr. sc. Irena Jukić, docent
Dr. sc. Radovan Vrhovac, redoviti profesor

Rad prihvaćen: 15. studenoga 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral dissertation

THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON RECOVERY OF HEMATOPOETIC STEM CELLS AND LEUKOCYTES SUBPOPULATION COLLECTED FROM PERIPHERAL BLOOD BY LEUKAPHERESIS

Vladimira Rimac

SUMMARY

Due to the expansion of cell therapy using not only haematopoietic stem cells (HSC) but also other leukocyte subpopulations, the loss of these cells in cryopreserved apheresis products needs to be evaluated. The primary aim of this prospective study was to evaluate the post-thaw recovery of HSC and leukocyte subpopulations using the flow cytometry 7-AAD and 7-AAD/annexin V methods. The secondary aim was to assess how the post-thaw recovery is affected by various parameters, and the third aim was to examine how the time of exposure to cryoprotective solution containing DMSO after thawing affects the sample stability and viability of HSC and leukocyte subpopulations in autologous and allogeneic PBSC samples. In samples of 30 autologous and 30 allogeneic PBSC products, the number of viable HSC, T and B lymphocytes, NK cells and monocytes was determined using the "single-platform" method. The stability of the samples post-thaw was tested at three points: immediately after thawing and one hour and three hours post-thaw. The lowest post-thaw recovery was observed in autologous and allogeneic for CD34+ cells. In leukocyte subpopulation, the lowest post-thaw recovery was observed for CD14+ cells, both autologous and allogeneic. The highest post-thaw recovery was observed for CD3+/CD8+ cells in autologous, and for CD19+ cells in allogeneic samples. The statistically significant difference was observed between autologous and allogeneic PBSC products for CD3+ cell recovery and CD3+/CD8+ cell recovery. The evaluation of factors that could adversely affect the post-thaw recovery in autologous samples showed weak negative correlations between platelet concentration and CD3+ recovery, as well as between storage time and CD3+/CD8+ recovery. In allogeneic samples, a strong negative correlation was observed only between the percentage of granulocytes and CD3+, CD3+/CD8+ and CD3+/CD4+ cell recoveries. Analysis of the absolute count of viable cells in thawed samples showed a significant difference between all measurement points for CD34+, CD14+ and CD19+ cells. No significant differences were observed for post-thaw stability of allogeneic samples analysed between products stored before cryopreservation ≥ 24 hours (N=20), and those stored < 24 hours (N=10), except for viable CD3+/CD4+ cells after three hours post-thaw. Since various post-thaw recoveries of leukocyte subpopulations were observed, the cell therapy manufacturing centers should evaluate how their cryopreservation method and other factors affect the recovery of cell population of interest in their settings.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 103 pages, 15 figures, 13 tables and 123 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cell therapy, peripheral blood stem cells, leukocyte subpopulations, cryopreservation, post-thaw recovery

Mentors: Assistant Professor Ines Bojanić, PhD
Full Professor Sanja Dabelić, PhD

Reviewers: Associate Professor Marija Grdić Rajković, PhD
Assistant Professor Irena Jukić, PhD
Full Professor Radovan Vrhovac, PhD

The thesis was accepted: 15th November 2023