

mgr Paula Matuszak

**Bankowanie komórek hematopoetycznych.
Ocena warunków przetwarzania i przechowywania
jako kluczowych etapów wpływających
na bezpieczeństwo przeszczepu.**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Maria Kozłowska-Skrzypczak
prof. UMP



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Dziękuję,

*Pani Promotor dr hab. n med. Marii Kozłowskiej-Skrzypczak prof. UM
za cenne wskazówki, merytoryczną pomoc oraz życzliwość*

Dziękuję,

*mgr Paulinie Działkiewicz-Warkocz
za nieocenioną pomoc w realizacji części badawczej pracy*

Spis treści

1. Wstęp	12
1.1 Hematopoeza	12
1.2 Transplantacja komórek krwiotwórczych.....	15
1.2.1 Rodzaje transplantacji komórek krwiotwórczych	16
1.2.2 Źródła komórek krwiotwórczych przeznaczonych do transplantacji.....	17
1.3 System Zapewnienia Jakości w banku komórek	20
1.4 Czynniki wpływające na jakość pozyskanego materiału - przed etapem bankowania	22
1.4.1 Czynniki osobnicze	23
1.4.2 Mobilizacja komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej.....	24
1.4.3 Sposób pozyskania komórek krwiotwórczych - rodzaj separatora komórkowego.....	25
1.4.4 Warunki transportu.....	26
1.5 Czynniki wpływające na jakość pozyskanego materiału komórkowego – po dostarczeniu do banku komórek	28
1.5.1 Objętość preparatu komórek krwiotwórczych	28
1.5.2 Stężenie komórek jednojądrowych	29
1.5.3 Warunki krótkoterminowego przechowywania komórek	30
krwiotwórczych	30
1.5.4 Rodzaj użytego krioprotektanta	31
1.5.5 Sposób krioprezervacji	32
1.5.6 Warunki przechowywania długoterminowego.....	33
1.5.7 Sposób rozmrażania	34
1.6. Ilościowo-jakościowa ocena materiału transplantacyjnego	35
1.6.1 Liczba i żywotność komórek jednojądrowych	35
1.6.2 Odsetek i żywotność komórek CD34+	36
1.6.3 Potencjał proliferacyjny komórek krwiotwórczych	37

2. Cel pracy	40
3. Materiał i metoda	41
3.1 Materiał.....	41
3.1.1 Pozyskanie materiału.....	41
3.1.2 Materiał poddawany redukcji osocza	42
3.1.3 Przechowywanie materiału po przeprowadzonej leukaferze w różnych warunkach.....	42
3.2 Metody	45
3.2.1 Pozyskanie materiału.....	45
3.2.2 Ocena liczby komórek.....	47
3.3 Ocena żywotności komórek.....	51
3.3.1 Określanie żywotności komórek jednojądrowych metodą wchłaniania błękitu trypanu.....	51
3.3.2 Oznaczanie odsetka żywych komórek CD34+ przy użyciu metody cytometrii przepływowej z 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD)	52
3.4 Redukcja osocza	53
3.5 Krioprezerwacja prób komórek krwiotwórczych	55
3.6 Przechowywanie prób komórek krwiotwórczych.....	56
3.7 Rozmrażanie prób komórek krwiotwórczych.....	57
3.8 Testowanie rozmrożonych komórek krwiotwórczych.....	57
3.9 Analiza statystyczna	58
4. Wyniki	59
4.1 Analiza prób pod względem zastosowanego do leukaferzy separatora komórkowego	59
4.1.1 Porównanie objętości uzyskanego preparatu w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra).....	59
4.1.2 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych (MNC) w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra).....	60

4.1.3 Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra).....	61
4.1.4 Porównanie żywotności komórek CD34+ metodą cytometrii przepływowej z użyciem 7-AAD przed zamrożeniem w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)	63
4.1.5 Porównanie żywotności komórek CD34+ po rozmrożeniu oceniana metodą cytometrii przepływowej w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)	64
4.1.6 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych po rozmrożeniu oceniana w teście z błękitem trypanu w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)	65
4.1.7. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz wieku	67
4.1.8. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz płci	68
4.2 Preparatyka	69
4.2.1 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w preparacie przed i po redukcji osocza	69
4.2.2 Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w preparacie przed i po redukcji osocza.....	70
4.2.3 Porównanie odsetka komórek CD34+ w preparacie przed i po redukcji osocza.....	72
4.2.4 Porównanie żywotności komórek CD34+ w preparacie po rozmrożeniu poddanych i niepoddanych redukcji osocza	73
4.3 Analiza ilościowo-jakościowych parametrów z uwzględnieniem warunków przechowywania materiału komórkowego	74
4.3.1 Porównanie odsetka komórek CD34+ w świeżym materiale (przed zamrożeniem) w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h ...	74
4.3.2 Porównanie odsetka komórek CD34+ w świeżym materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h....	75

4.3.3 Porównanie odsetka komórek w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h.....	77
4.3.4 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	79
4.3.5 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h	80
4.3.6 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h.....	82
4.3.7 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	83
4.3.8 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	85
4.3.9 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	88
4.3.10 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	90
4.3.11 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h	91
4.3.12 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych przed zamrożeniem metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	93
4.3.13 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	96
4.3.14 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h	98

4.3.15 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	99
4.3.16 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	102
4.3.17 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h	104
4.3.18 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	106
4.3.19 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h..	108
4.3.20 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h.....	110
4.3.21 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ k.j. po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h	112
4.3.22 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ komórek jednojądrowych po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	114
4.3.23 Porównanie liczby CFU-GM/10 ⁵ k.j. po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h.....	117
4.3.24 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [x10 ⁹] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h....	118
4.3.25 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [x10 ⁹] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h..	120
4.3.26 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [x10 ⁹] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h.....	122

4.3.27 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h.....	124
4.3.28 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h.....	126
4.3.29 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h.....	128
4.3.30 Porównanie odsetka limfocytów [%] przed zamrożeniem w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C w 20°C po 24h i 48h.....	129
4.3.31 Porównanie odsetka limfocytów [%] po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h	130
4.3.32 Porównanie odsetka granulocytów [%] przed zamrożeniem w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h.....	131
4.3.33 Porównanie odsetka granulocytów [%] po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h	133
5. Dyskusja.....	135
6. Wnioski.....	161
7. Streszczenie	162
8. Summary.....	164
9. Spis tabel.....	166
10. Spis rycin	172
11. Spis wykresów	173
12. Piśmiennictwo.....	177

Wykaz skrótów

7-AAD	- 7-aminoaktynomycyna D
ACD-A	- cytrynian dekstrozy (ang. <i>citrate dextrose A</i>)
allo-KK	- transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych
auto-KK	- transplantacja autologicznych komórek krwiotwórczych
BFU-E	- wczesna ukierunkowana komórka układu czerwonekrwinkowego (ang. <i>Burst Forming Unit-Erythroid</i>)
BFU-Meg	- wczesna ukierunkowana komórka megakariopoezy (ang. <i>Burst Forming Unit-Megakaryocyte</i>)
BK	- bank komórek
BKM	- Bank Komórek Macierzystych
CD	- antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>)
CFU-Baso	- prekursor granulocytów zasadochłonnych (ang. <i>Colony Forming Unit-Basophil</i>)
CFU-E	- późna ukierunkowana komórka erytroidalna (ang. <i>Colony Forming Unit-Erythroid</i>)
CFU-Eo	- prekursor granulocytów kwasochłonnych (ang. <i>Colony Forming Unit-Eosinophil</i>)
CFU-G	- ukierunkowana komórka układu granulocytarnego (ang. <i>Colony Forming Unit-Granulocyte</i>)
CFU-GEMM	- wielopotencjalna komórka tworząca kolonie dla szeregu granulocytarnego, erytroidalnego, monocytowego, megakariocytowego (ang. <i>Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Monocyte, Megakaryocyte</i>)
CFU-GM	- ukierunkowana komórka układu granulocytarnego i monocytowego (ang. <i>Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte</i>)

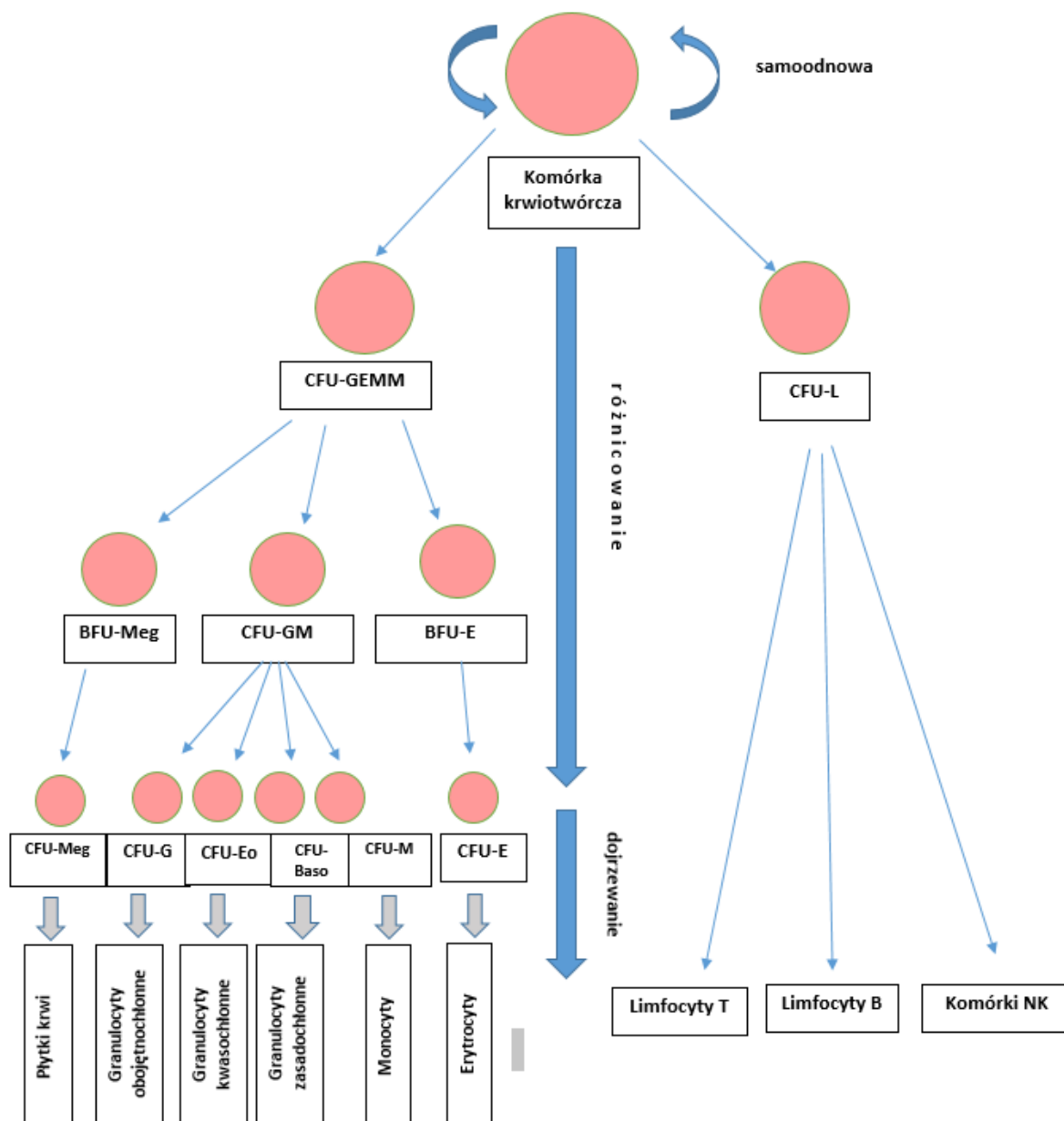
CFU-L	- wielopotencjalna komórka limfoidalna (<i>ang. Colony Forming Unit-Lymphocyte</i>)
CFU-M	- prekursor układu monocytowego (<i>ang. Colony Forming Unit- Monocyte</i>)
CFU-Meg	- późna ukierunkowana komórka megakariopoezy (<i>ang. Colony Forming Unit-Megakaryocyte</i>)
cMNC	- ciągła zbiórka komórek jednojądrowych (<i>ang. continuous mononuclear cell collection</i>)
CXCR-4	- (<i>ang. C-X-C chemokine receptor type-4</i>)
DMSO	- dimetylosulfotlenek (<i>ang. dimethyl sulfoxide</i>)
EBMT	- Europejska Grupa Przeszczepiania Krwi i Szpiku Kostnego; <i>ang. European Society for Blood and Marrow Transplantation;</i>).
G-CSF	- czynnik stymulujący wytwarzanie granulocytów (<i>ang. Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>)
GM-CSF	- czynnik stymulujący wytwarzanie granulocytów i makrofagów; <i>ang. granulocyte-macrophage-CSF</i>)
GVHD	- choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (<i>ang. graft versus host disease</i>)
HD	- chłoniak Hodgkina (<i>ang. Hodgkin disease</i>)
HSA	- ludzka albumina; <i>ang. human serum albumin</i>).
JACIE	- Wspólna Komisja Akredytacyjna (<i>ang. Joint Accreditation Committee-ISCT</i>)
KCBTiK	- Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek
KK	- komórka krwiotwórcza
MM	- szpiczak plazmocytowy (<i>ang. Multiple Myeloma</i>)
MNC	- zbiórka komórek jednojądrowych (<i>ang. mononuclear cell collection</i>)

NHL	- chłoniak nieziarniczny (<i>ang. Non-Hodgkin Lymphoma</i>)
PBSC	- komórki macierzyste pozyskane z mobilizowanej krwi obwodowej; (<i>ang. peripheral blood stem cells</i>)
SDF-1	- stromalny czynnik wzrostu- 1 (<i>ang. stroma-derived factor-1</i>)
SOP	- standardowe procedury operacyjne
SZJ	- system zapewnienia jakości
TNC	- całkowita liczba komórek jednojądrowych (<i>ang. total nuclear cells</i>)
TPV	- całkowita objętość krwi przetworzonej (<i>ang. total processed blood volume</i>)
WMDA	- Światowe Stowarzyszenie Dawców Szpiku (<i>ang. World Marrow Donor Association</i>)

1. Wstęp

1.1 Hematopoeza

Stosunkowo najlepiej poznaną komórką o charakterze multipotencjalnym jest komórka krwiotwórcza, która bierze udział w krwiotworzeniu. Hematopoeza to proces polegający na wytwarzaniu dojrzałych elementów morfotycznych krwi w konsekwencji proliferacji i dojrzewania krwiotwórczych komórek macierzystych. Tworzenie całego układu krwiotwórczego rozpoczyna się we wczesnych etapach zarodkowych. Sam układ krwiotwórczy pochodzi z mezodermy, czyli jednego z trzech listków zarodkowych. Komórki krwiotwórcze między 6. a 12. tygodniem ciąży migrują do wątroby i śledziony, gdzie powstają wszystkie rodzaje krwinek. W 16. tygodniu ciąży powstaje szpik kostny, który przejmuje funkcje krwiotwórcze. Dojrzałe komórki zostają uwolnione do krążenia ogólnego, a w szpiku pozostaje niewielka pula komórek niezróżnicowanych. Unikalną cechą układu krwiotwórczego jest migracja komórek w trakcie rozwoju. Wszystkie inne narządy w ludzkim organizmie pozostają w miejscu wytworzenia. Hematopoeza jest zorganizowanym, hierarchicznym układem komórkowym, w którym na samym szczycie znajduje się komórka krwiotwórcza (KK) zdolna do samoodnowy i różnicowania w komórki potomne. Samoodnowa, czyli zdolność do wytwarzania w wyniku podziałów komórek identycznych jak dzieląca się komórka, sprawia, że może ona funkcjonować w ludzkim organizmie przez wiele lat. Druga cecha charakteryzująca KK to zdolność do różnicowania, czyli wytworzenia bardziej dojrzałych komórek, zdolnych do pełnienia określonych funkcji w organizmie. Aby organizm mógł prawidłowo funkcjonować, ważne jest zachowanie równowagi między procesem samoodnawiania i różnicowania [1, 2].



Rycina 1. Uproszczony schemat hematopoezy (schemat własny)

CFU-GEMM - wielopotencjalna komórka tworząca kolonie dla szeregu granulocytarnego, erytrocytarnego, monocytarnego i płytkowego, **CFU-L** - wielopotencjalna komórka limfoidalna, **BFU-Meg** - wczesna ukierunkowana komórka megakariopoezy, **CFU-Meg** - późna ukierunkowana komórka megakariopoezy, **CFU-GM** - ukierunkowana komórka układu granulocytarnego i monocytowego, **CFU-G** - ukierunkowana komórka układu granulocytarnego, **CFU-Eo** - prekursor granulocytów kwasochłonnych, **CFU-Baso** - prekursor granulocytów zasadochłonnych, **CFU-M** - prekursor układu monocytowego, **BFU-E** - wczesna ukierunkowana komórka erytroidalna, **CFU-E** - późna ukierunkowana komórka erytroidalna

W pierwszym etapie hematopoezy powstają komórki wielopotencjalne dla mielopoezy i limfopoezy. Wielopotencjalna komórka macierzysta dla mielopoezy CFU-GEMM (*colony forming unit- granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*) daje początek m.in. komórkom progenitorowym układu granulocytarnego i monocytowego CFU-GM (*colony forming unit- granulocyte, monocyte*), które następnie dojrzewają. W efekcie powstają komórki prekursorowe dla układu granulocytarnego CFU-G (*colony forming unit-granulocyte*), monocytowego CFU-M (*colony forming unit-monocyte*) oraz prekursory dla granulocytów kwasochłonnych CFU-Eo (*colony forming unit-eosinophil*) i zasadochłonnych CFU-Baso (*colony forming unit-basophil*). Wielopotencjalna komórka macierzysta dla mielopoezy daje również początek układowi czerwonokrwinkowemu, w którym w kolejnych etapach powstają komórki wczesne BFU-E (*burst forming unit- erythroid*) następnie późne CFU-E (*colony forming unit-erythroid*). Z CFU-GEMM tworzą się również komórki ukierunkowane dla układu płytkotwórczego BFU-Meg (*burst forming unit-megakaryocyte*). W końcowym etapie różnicowania i dojrzewania powstają komórki dojrzałe, morfologicznie rozpoznawalne, pełniące określone funkcje w organizmie czyli erytrocyty, płytki krwi, granulocyty zasadochłonne, kwasochłonne i obojętnochłonne oraz monocyty. Wielopotencjalna komórka macierzysta dla limfopoezy CFU-L (*colony forming unit-lymphocyte*) różnicuje się w limfocyty T, B i komórki NK (*natural killer*) [3; 4, 5].

Proces krwiotworzenia jest warunkowany genetycznie oraz przez wzajemne oddziaływania między komórkami. W skład mikrośrodowiska szpiku wchodzi komórki hematopoetyczne i niehematopoetyczne, które biosyntetyzują produkty zewnątrzkomórkowe oraz cytokiny. Mikrośrodowisko szpiku tworzy osteoblastyczna i okołonaczyniowa nisza szpikowa. Komórki krwiotwórcze w niszy osteoblastycznej pozostają w spoczynku natomiast w niszy okołonaczyniowej w fazie aktywacji. Wzajemne interakcje opierają się na reakcji ligand-receptor. Główną rolę w procesie krwiotworzenia odgrywają cząsteczki adhezyjne i cytokiny [6, 7]. Cytokiny warunkują przeżycie komórek, a w większych stężeniach są dla nich czynnikami wzrostu. Czynniki Steel jest odpowiedzialny za regulację natężenia proliferacji różnicujących się komórek. FLT3 ligand pobudza komórki macierzyste; należy do kinaz tyrozynowych. Interleukina 3 jest cytokiną odpowiedzialną za wzrost komórek na każdym poziomie zróżnicowania. Erytropoetyna to hormon odpowiedzialny za prawidłowy przebieg erytropoezy, wytwarzany w nerkach. Trombopoetyna jest związkiem wpływającym na wytwarzanie płytek krwi. G-CSF (czynnik stymulujący wytwarzanie granulocytów;

ang. granulocyte colony stimulating factor;) jest odpowiedzialny za wytwarzanie granulocytów, GM-CSF (czynnik stymulujący wytwarzanie granulocytów i makrofagów; *ang. granulocyte-macrophage-CSF;*) bierze udział w wytwarzaniu granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów. Czynniki te znalazły zastosowanie w praktyce klinicznej. Obecnie G-CSF jest wykorzystywany przy mobilizacji KK w celu przemieszczenia tych komórek ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Inne czynniki wspomagające dojrzewanie układu krwiotwórczego to IL-2, IL-4, IL-5. Do grupy cząsteczek adhezyjnych zwanych integrynami, zaliczamy VLA (*Very Late Antigen*), które są odpowiedzialne za przyleganie KK do podścieliska. Proces hematopoezy jest niezwykle złożony i jego funkcjonowanie zależy od wzajemnej współpracy wielu czynników. [8] Należy tu wspomnieć o istotnej dla procesu zasiedlania osi funkcjonalnej SDF-1 - CXCR-4. SDF-1 jest hemokiną wytwarzaną przez podścielisko szpiku kostnego o najsilniejszej ekspresji w osteoblastach oraz komórkach śródbłonna. Natomiast CXCR-4 jest receptorem obecnym na KK. Im młodsza komórka tym większa ekspresja receptora CXCR-4. Oś funkcjonalna SDF-1-CXCR-4 jest istotna dla KK, ich różnicowania, dojrzewania i uwalniania do krwioobiegu. Poznanie mechanizmów osi jest ważne w transplantologii hematologicznej. Istota mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych polega na proteolizie SDF-1, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia jego stężenia i uwolnienia KK do krwi obwodowej. Natomiast w wyniku procesu transplantacji dochodzi do reakcji odwrotnej niż w mobilizacji. Komórki krwiotwórcze muszą przedostać się przez barierę krew-szpik z krwi obwodowej do szpiku kostnego. W szpiku kostnym dochodzi do „zasiedlenia” (tzw. homing) oraz „zakotwiczenia” (tzw. lodgement). Dzięki „zasiedleniu” jest możliwe skuteczne przeprowadzenie transplantacji, gdyż komórki biorcy, po ich podaniu dawcy, migrują w krwioobiegu do miejsca docelowego - nisz szpikowych. Proces „zasiedlenia” polega na wzajemnej interakcji i sygnalizacji między chemokinami, receptorami chemokin, cząsteczkami adhezyjnymi i proteazami, dążąc w konsekwencji do adhezji KK w niszach szpikowych [9,10].

1.2 Transplantacja komórek krwiotwórczych

Historia transplantacji komórek krwiotwórczych sięga lat 50 XX wieku, kiedy to po raz pierwszy przeszczepiono własne komórki myszy poddanej wcześniej napromienianiu. Pierwsza transplantacja połączona z kondycjonowaniem chorego została

przeprowadzona w 1957 roku przez Edwarda Donnell'a Thomasa w Nowym Jorku. Kondycjonowanie ma na celu przygotowanie miejsca w szpiku dla przeszczepionych komórek. Śmiertelność w pierwszych latach była dość wysoka, zmniejszała się wraz ze zdobywaniem wiedzy i doskonaleniem technik przygotowania pacjenta do procedury oraz opieki potransplantacyjnej. Obecnie na całym świecie przeprowadzono już ponad milion przeszczepień komórek krwiotwórczych. Liczba zarejestrowanych w Polsce potencjalnych dawców szpiku dynamicznie rośnie, na koniec grudnia 2020 roku wynosiła prawie dwa miliony [11]. Instytucją zajmującą się koordynacją pobrań oraz przeszczepień komórek krwiotwórczych w Polsce jest Poltransplant. Natomiast WMDA (Światowe Stowarzyszenie Dawców Szpiku; ang. *World Marrow Donor Association*) jest organizacją o międzynarodowym zasięgu zajmującą się globalną współpracą w zakresie transplantacji komórek krwiotwórczych. Procedura transplantacji z roku na rok jest coraz częściej wykorzystywana. Na przestrzeni lat, co należy podkreślić, zmieniał się profil dawców. W Polsce w 2019 roku wykonano 1162 transplantacje. Według Światowej Organizacji Zdrowia rocznie na świecie wykonuje się około 50 000 transplantacji komórek krwiotwórczych i liczba ta z roku na rok rośnie [12]. Organizacją, która zajmuje się gromadzeniem i analizą pozyskanych informacji odnośnie przeprowadzonych transplantacji w Europie jest EBMT (Europejskie Towarzystwo Przeszczepów Krwi i Szpiku Kostnego; ang. *European Society for Blood and Marrow Transplantation*),. Począwszy od roku 1990 liczba przeszczepień na całym świecie stale rośnie. W roku 2018 liczba transplantacji w Europie wynosiła ponad 47000. Obecnie wyraźniejszy wzrost można dostrzec w przypadku transplantacji komórek allogenicznych. Najczęstszym wskazaniem do przeprowadzenia transplantacji komórek allogenicznych jest ostra białaczka szpikowa, natomiast w przypadku transplantacji komórek autologicznych są to dysfunkcje komórek plazmatycznych [13].

1.2.1 Rodzaje transplantacji komórek krwiotwórczych

Istotą transplantacji KK jest trwałe odtworzenie hematopoezy. W intencji tego leczenia jest uzyskanie u chorego rekonstytucji prawidłowego krwiotworzenia. Proces ten jest poprzedzony podaniem pacjentowi wysokodawkowej chemioterapii mającej na celu „przygotowanie miejsca” dla przeszczepianych komórek.

Wyróżniamy transplantację autologicznych komórek krwiotwórczych (auto-KK) i allogenicznych komórek krwiotwórczych (allo-KK). W przypadku auto-KK komórki krwiotwórcze pochodzą od chorego. Po pobraniu materiał jest poddany ocenie ilościowo-

jakościowej, a następnie krioprezerwacji. Po zamrożeniu materiału, u pacjenta przeprowadza się mieloablację, a następnie przeszczepia się wcześniej przygotowane komórki krwiotwórcze. Zaletą tego typu transplantacji jest brak ryzyka wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, jednak pozyskany materiał może być zanieczyszczony komórkami nowotworowymi, które w późniejszym czasie mogą spowodować wznowę u pacjenta. Działanie przeciwnowotworowe przeszczepu jest związane w tym przypadku wyłącznie z odpowiedzią na leczenie wysokodawkową chemioterapią. W przypadku allo-KK komórki krwiotwórcze pozyskiwane są od drugiej osoby. W tym zakresie wyróżniamy transplantację od dawcy niespokrewnionego, gdy komórki pozyskuje się od obcej osoby, zgodnej w zakresie HLA (antygeny zgodności tkankowej; ang. *human leukocyte antigen*) oraz transplantację od dawcy rodzinnego, wtedy komórki pozyskuje się od osoby z rodziny. Alternatywą, ostatnio rozpowszechnioną w ośrodkach transplantacyjnych, jest przeszczepienie haploidentyczne. Wtedy dawcą jest rodzic lub rodzeństwo, w połowie zgodni w zakresie HLA. Wybór rodzaju transplantacji zależy od wielu czynników, przede wszystkim od rozpoznania, stopnia zaawansowania choroby oraz stanu biologicznego pacjenta [14,15].

1.2.2 Źródła komórek krwiotwórczych przeznaczonych do transplantacji

Pierwszym etapem leczenia chorych przy użyciu komórek krwiotwórczych jest ich pozyskanie. Obecnie dostępne są trzy źródła KK przeznaczonych do transplantacji: szpik kostny, mobilizowana krew obwodowa oraz krew pępowinowa. Każde z tych źródeł ma wady i zalety. W przypadku dawców allogenicznych komórek krwiotwórczych częściej i chętniej wybierana metoda pobrania to mobilizowana krew obwodowa. Częstsze pobieranie komórek krwiotwórczych z mobilizowanej krwi obwodowej aniżeli ze szpiku jest trendem występującym obecnie na całym świecie [16].

Cechy	Szpik kostny	Krew obwodowa	Krew pępowinowa
Średnia zawartość komórek CD34+ w materiale	$2,8 \times 10^6/\text{kg m.c.}$	$7 \times 10^6/\text{kg m.c.}$	$1,7 \times 10^5/\text{kg m.c.}$
Ryzyko dla dawcy związane z pobraniem komórek	występują	występują	brak
Czynniki ograniczające odnowę krwiotworzenia	dopasowanie układu zgodności tkankowej	dopasowanie układu zgodności tkankowej	mała liczba komórek w jednej jednostce krwi
Ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD)	wysokie	wysokie	niskie
Możliwość infuzji limfocytów dawcy	obecna	obecna	brak
Odnowa krwiotworzenia	ok. 21 dni	ok. 10 dni	powyżej 21 dni
Znieczulenie ogólne dawcy	występuje	brak	brak
Konieczność przyjmowania czynnika wzrostu	brak	występuje	brak

Tabela 1. Charakterystyka źródeł komórek krwiotwórczych (Mascotti K., McCullough J., Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. Transfusion 2000 Jun; 40(6):693-6)

W przypadku szpiku kostnego materiał pozyskiwany jest w znieczuleniu ogólnym z tylnych górnych kołców talerza kości biodrowych. W szpiku liczba KK wynosi 0,1% całkowitej liczby komórek. Pobranie polega na wielokrotnej aspiracji szpiku igłą punkcyjną i wstrzyknięciu materiału do worka kolekcyjnego, w którym znajduje się antykoagulant. Uznaje się, że materiał do transplantacji pozyskany ze szpiku powinien zawierać $2\text{--}5 \times 10^8$ komórek jądrowych/kg m.c. biorcy. W przypadku przeszczepienia materiału pozyskanego ze szpiku czas od podania do rekonstytucji wynosi około 21 dni, natomiast w przypadku komórek krwiotwórczych pochodzących z mobilizowanej krwi obwodowej jest to około 10 dni. Niekiedy dawcy szpiku skarżą się na ból w miejscu

wkłucia nawet do roku od przeprowadzenia procedury. Jednakże pobranie komórek krwiotwórczych ze szpiku nie wymaga przeprowadzenia procedury mobilizacji [16].

Obecnie częściej wykorzystuje się mobilizowaną krew obwodową jako źródło komórek krwiotwórczych. Do zalet tej metody możemy zaliczyć mniejszą inwazyjność zabiegu, szybszą rekonstytucję układu krwiotwórczego i odporności swoistej, a co za tym idzie krótszy okres hospitalizacji po transplantacji oraz mniejsze ryzyko infekcji w okresie cytopenii, bezpośrednio po transplantacji. Procedura pobrania komórek krwiotwórczych z mobilizowanej krwi obwodowej nie wymaga pobytu w szpitalu oraz pobrania krwi do autotransfuzji, co jest zazwyczaj konieczne w przypadku pobrania ze szpiku kostnego [17]. Aby móc pozyskać komórki krwiotwórcze z mobilizowanej krwi obwodowej konieczne jest przeprowadzenie tzw. mobilizacji. W piątym dniu przyjmowania czynnika wzrostu dokonuje się oceny morfologii krwi pacjenta oraz odsetka prekursorów CD34+ we krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej. W przypadku dawców niespokrewnionych pobranie komórek krwiotwórczych odbywa się zawsze w piątym dniu przyjmowania czynnika wzrostu. Natomiast u pacjentów, w celu rozpoczęcia zabiegu leukaferazy, iloczyn otrzymanych wartości liczby leukocytów i odsetka prekursorów CD34+ powinien wynosić powyżej 10 komórek CD34+/ μ l [18].

Tak naprawdę trudno określić minimalną liczbę komórek potrzebną do przeszczepienia. Na podstawie posiadanej wiedzy i doświadczeń ośrodków transplantacyjnych przyjmuje się, że jest to 2×10^6 CD34+/kg m.c. biorcy. Z danych literaturowych wynika, że rekonstytucję uzyskano również w przypadku podania pacjentowi $0,75 \times 10^6$ CD34+/kg m.c. biorcy. Jeżeli w wyniku pierwszej aferezy nie uzyska się wymaganej liczby komórek zabieg należy powtórzyć. Optymalnie materiał transplantacyjny powinien zawierać $4-4,5 \times 10^6$ CD34+/kg m.c. biorcy [19, 20]. Niestety, są sytuacje, w których w wyniku dwóch lub nawet trzech leukaferaz nie można uzyskać liczby komórek $>2 \times 10^6$ CD34+/kg m.c.. Wtedy mamy do czynienia z osobą „słabo mobilizującą” (ang. „poor mobilizer”). Do czynników wpływających na wydajność zbiórki należą niewątpliwie: wiek pacjenta, w tym im starszy pacjent, tym gorsza zbiórka, płeć żeńska, a także ogólny stan zdrowia i wskaźnik masy ciała (*Body Mass Index*, BMI). Komórki krwiotwórcze pozyskane z krwi obwodowej szybciej migrują do szpiku i w krótszym czasie prowadzą do odtworzenia hematopoezy niż w przypadku komórek pozyskanych ze szpiku. Jest to związane z obecnością na ich powierzchni mikrofragmentów błonowych pochodzenia płytkowego PMP. Wadą KK pochodzących z krwi obwodowej jest dużo większe ryzyko wystąpienia przewlekłej

GVHD (choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi; ang. *graft versus host disease*) niż w przypadku szpiku kostnego, ze względu na wyższą liczbę limfocytów T w materiale [16, 21].

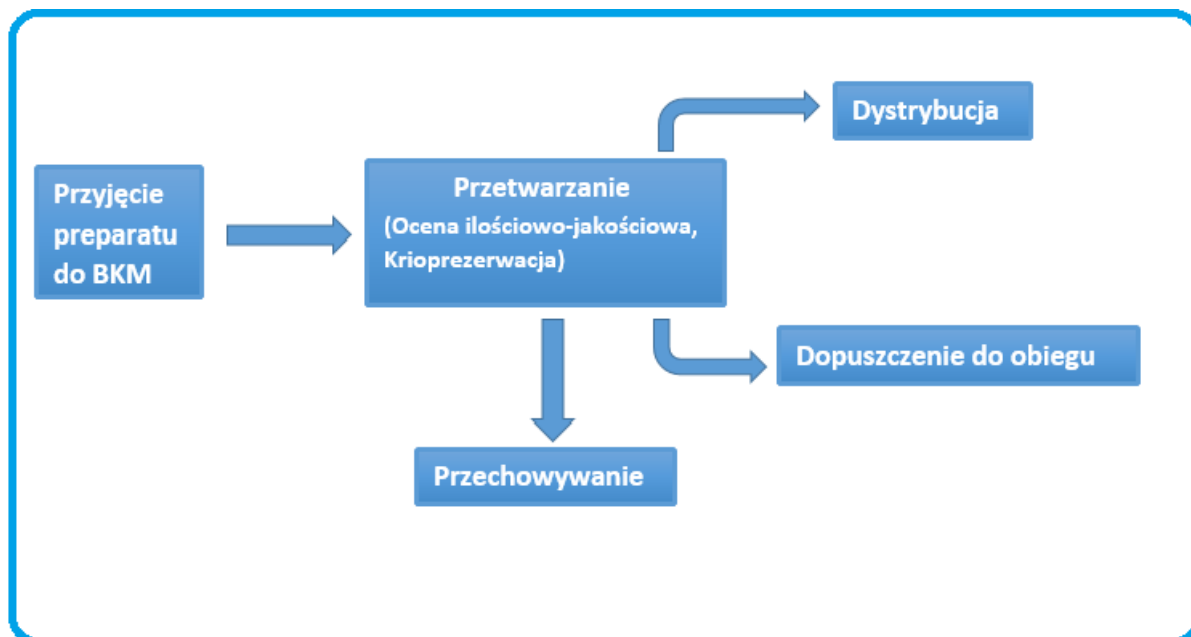
Alternatywnym źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych jest krew pępowinowa pozyskiwana podczas porodu po przecięciu pępowiny. Komórki te cechuje wysoka zdolność repopulacyjna i niskie ryzyko wystąpienia GVHD. Do zalet krwi pępowinowej możemy zaliczyć także brak ryzyka wystąpienia powikłań u dawcy oraz mniejsze ryzyko przeniesienia infekcji wirusowych. Jednakże liczba komórek pozyskana jednorazowo zwykle nie wystarcza do przeszczepienia ich dorosłej osobie. W takiej sytuacji konieczne jest łączenie kilku jednostek krwi. Nie ma również możliwości późniejszej infuzji limfocytów dawcy oraz występuje większa liczba niepowodzeń transplantacji. Czas rekonstrukcji jest znacznie dłuższy niż po transplantacji komórek krwiotwórczych ze szpiku lub mobilizowanej krwi obwodowej. Wydłużony czas hospitalizacji łączy się też z większym ryzykiem powikłań infekcyjnych [22].

1.3 System Zapewnienia Jakości w banku komórek

Obecnie wszelkie procedury związane z przygotowaniem materiału transplantacyjnego odbywają się w bankach komórek (BK), które mogą funkcjonować dopiero po uzyskaniu zgody Ministra Zdrowia. Pozwolenie takie wydawane jest na okres 5 lat. Wszelkie czynności wykonywane w BK czyli pobieranie, testowanie, gromadzenie, przechowywanie i przetwarzanie muszą być przeprowadzane w myśl Ustawy Transplantacyjnej z dnia 1 lipca 2005 roku. Jednostką nadzorującą wszystkie banki tkanek i komórek pod względem merytorycznym jest Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek (KCBTiK). Personel pracujący w bankach komórek powinien co najmniej raz na dwa lata uczestniczyć w szkoleniach organizowanych przez KCBTiK. Oprócz tego na początku każdego roku ustalany jest harmonogram szkoleń wewnętrznych oraz zewnętrznych organizowanych wspólnie z jednostkami współpracującymi z bankiem komórek. Organizacja szkoleń wewnętrznych należy do BK. Aby zachować jak najwyższe bezpieczeństwo przygotowywanego materiału w banku funkcjonuje System Zapewnienia Jakości (SZJ), który obejmuje standardowe procedury operacyjne (SOP), instrukcje, formularze i protokoły. Praca banku komórek powinna być dokumentowana. W trakcie wykonywania czynności preparatywnych wszystkie etapy pracy banku muszą być odnotowywane, dzięki temu będzie możliwe odtworzenie wszystkich procesów związanych z pobieraniem, testowaniem,

gromadzeniem, przechowywaniem i przetwarzaniem materiału komórkowego. System Zapewnienia Jakości w bankach komórek ma na celu zagwarantowanie, że przygotowany w banku materiał jest zgodny z krajowymi wymogami oraz procedurami obowiązującymi w danym banku oraz spełnia określone kryteria jakościowe. Kontrola jakości w bankach jest nieodzownym elementem ich funkcjonowania i zmniejsza ryzyko wydania materiału niezgodnego z kryteriami SZJ, a w razie wystąpienia nieprawidłowości pozwala na wprowadzenie działań korygujących i zapobiegawczych. Osobą nadzorującą funkcjonowanie banku w myśl ustawy jest „Osoba Odpowiedzialna”. W celu zapewnienia najwyższej jakości materiału przygotowywanego w banku bardzo istotne jest przeprowadzanie walidacji procesów, kwalifikacji i kalibracji sprzętu oraz terminowe, coroczne przeprowadzanie przeglądów. Procedura kwalifikacji i walidacji oraz przeglądy są przeprowadzane raz w roku, zgodnie z przyjętym harmonogramem [23, 24]. Wskazane jest, aby za jakość w banku odpowiedzialna była „Osoba do spraw Jakości”. Osoba na takim stanowisku prowadzi nadzór nad dokumentacją prowadzoną w BK, weryfikuje stany magazynowe i zamówienia, kontroluje ważność przeglądów sprzętu znajdującego się w BK. Ponadto Osoba ds. Jakości wykonuje bądź zleca przeprowadzenie walidacji sprzętów oraz kwalifikacji procesów przeprowadzanych w banku komórek.

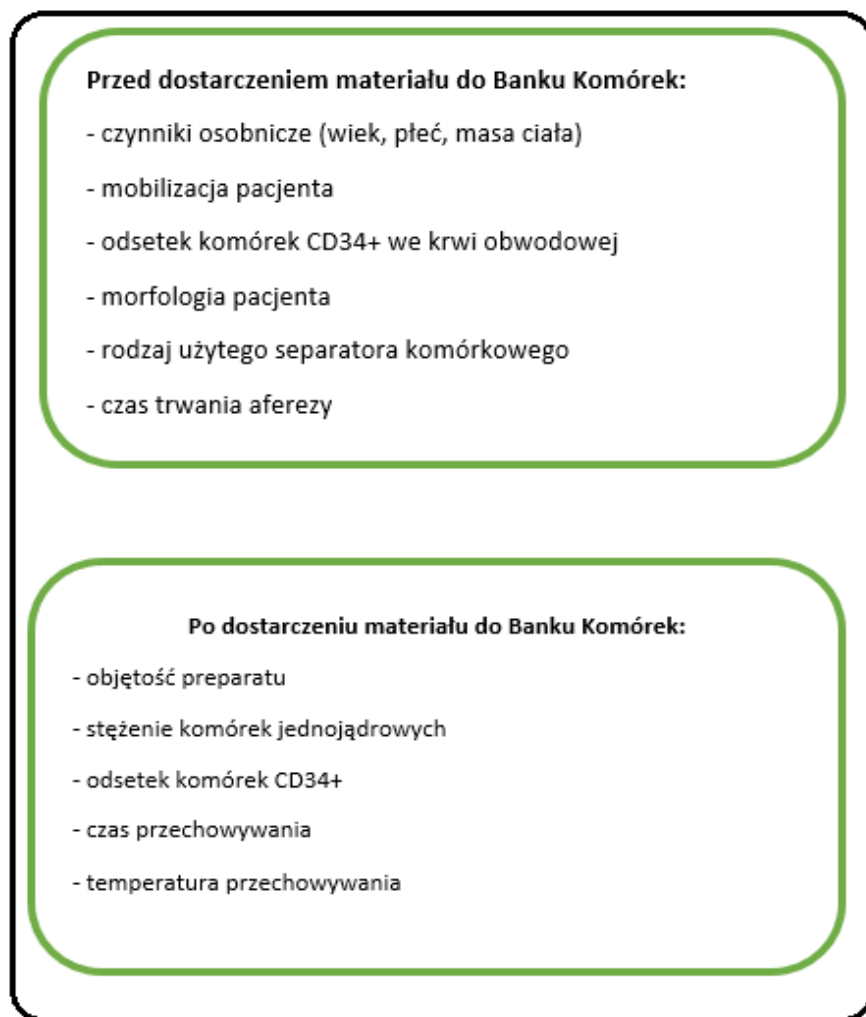
Wszystkie te procesy przeprowadzane w banku komórek są ściśle związane z pracą oddziału transplantacyjnego. W Poznaniu jest to Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku. Po przeprowadzeniu zabiegu leukaferazy bądź pobrania szpiku kostnego pozyskany materiał trafia do BK. Zgodnie z mapą procesów funkcjonującą w SZJ banku komórek materiał transplantacyjny bądź limfocyty dawcy są przyjmowane do banku komórek. Kolejnym etapem jest przetwarzanie i przechowywanie komórek, a w konsekwencji ich dystrybucja do ośrodka macierzystego bądź innego niż macierzysty.



Rycina 2. Zakres działalności Banku Komórek Macierzystych w Poznaniu (schemat własny)

1.4 Czynniki wpływające na jakość pozyskanego materiału - przed etapem bankowania

Na parametry ilościowo-jakościowe komórek krwiotwórczych ma wpływ wiele czynników, które decydują o końcowym powodzeniu procedury transplantacji i mają podstawowe znaczenie dla przebiegu i wyniku leczenia pacjenta. Już przed dostarczeniem materiału do BK, na etapie mobilizacji wydajność zbiórki zależy od czynników osobniczych, sposobu mobilizacji a także rodzaju użytego separatora. Niewątpliwie istotne są warunki transportu w tym temperatura oraz czas jego trwania. Na jakość materiału po dostarczeniu do BK ma wpływ sposób i czas przechowywania do momentu krioprezervacji, liczba komórek CD34+, a także stężenie komórek jednojądrowych w materiale. Wszystkie wymienione wyżej aspekty mają wpływ na późniejsze powodzenie transplantacji.



Rycina 3. Czynniki wpływające na parametry ilościowo-jakościowe komórek krwiotwórczych (schemat własny)

1.4.1 Czynniki osobnicze

Istotne znaczenie dla wydajności kolekcji ma wiek pacjenta. Osoby starsze z reguły mają niższe wartości odsetka komórek CD34+ w materiale pozyskanym w wyniku leukaferozy niż osoby młodsze. Może to wynikać z naturalnego zjawiska starzenia i śmierci komórek CD34+ wraz z wiekiem. U osób starszych zdolność do samoodnawiania komórek krwiotwórczych jest dużo niższa, niż u osób młodszych. Wraz z wiekiem dochodzi do erozji telomerów, mutacji w pojedynczych genach, uszkodzeń DNA oraz upośledzenia procesu autofagii komórek. Proces skrócenia telomerów wiąże się z poważnymi nieprawidłowościami w funkcjonowaniu komórek krwiotwórczych [25]. Zgodnie z danymi literaturowymi wiek dawcy jest najważniejszym czynnikiem determinującym wybór potencjalnego dawcy w przypadku transplantacji komórek allogenicznych. Zgodnie z literaturą liczba komórek macierzystych

w organizmie ludzkim zmniejsza się wraz z wiekiem [26]. Na końcowy efekt aferezy ma wpływ również płeć dawcy. Estrogen i testosteron są hormonami, które wpływają na proliferację i różnicowanie komórek macierzystych. Testosteron powoduje wzrost proliferacji komórek krwiotwórczych. Poziom estrogenu u kobiet w wieku rozrodczym jest wysoki, co wpływa na lepszą wydajność zbiórki niż u kobiet starszych. Płeć żeńska niekorzystnie wpływa na wydajność kolekcji. Duże znaczenie ma również stan biologiczny pacjenta, stopień zaawansowania choroby, intensywność dotychczasowego leczenia, a także występowanie chorób współistniejących. Należy także wspomnieć o różnicach płynących z pobierania komórek od pacjentów chorujących na choroby hematologiczne oraz od zdrowych dawców. W przypadku chorych możemy zaobserwować ujemną korelację między całkowitą objętością krwi przetworzonej (TPV ang. *total processed blood volume*) a wydajnością zbiórki. Sytuacja wygląda odwrotnie jeśli mamy do czynienia ze zdrowym dawcą. W przypadku pacjentów ze schorzeniami hematologicznymi przebyte leczenie może również istotnie wpłynąć na końcowy efekt mobilizacji oraz efektywność zbiórki. Często chemioterapia bądź radioterapia nieodwracalnie uszkadzają komórki krwiotwórcze [27]. Przykładowo, cukrzyca jest jednostką chorobową zmniejszającą ilość prekursorów CD34+ krążących we krwi obwodowej po mobilizacji. Zjawisko to może być związane z zaburzeniem krążenia [28, 29]. Oprócz wspomnianych wyżej czynników również masa ciała wpływa na wydajność leukaferazy. Osoby z wyższym BMI wykazują lepszą odpowiedź na czynnik wzrostu, a tym samym wydajność leukaferazy jest wyższa. Ośrodki dawców szpiku jako graniczną minimalną masę ciała dawcy przyjęły 50 kg [30].

1.4.2 Mobilizacja komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej

W stanie fizjologicznym liczba KK we krwi obwodowej jest bardzo mała, dlatego przed pobraniem konieczna jest mobilizacja, która pozwoli na krótkotrwałe przemieszczenie tych komórek ze szpiku do krwi obwodowej. Niewątpliwie jednymi z kluczowych momentów w procesie leczenia transplantacyjnego KK jest mobilizacja i kolekcja. Wyróżniamy trzy metody mobilizacji: podanie czynnika wzrostu, połączenie czynnika wzrostu z chemioterapią tzw. chemomobilizacja oraz podanie Prelixaforu. Mobilizacja bez stosowania chemioterapii jest mniej kosztowna, może być przeprowadzana w warunkach ambulatoryjnych, jednakże jest możliwa tylko w przypadku stabilnej remisji choroby podstawowej, a także u zdrowych dawców.

Natomiast mobilizacja po wcześniejszej chemioterapii cechuje się większą wydajnością zbiórki, ale także większą toksycznością. Podanie pacjentowi chemioterapii niszczy potencjalne, przetrwałe komórki nowotworowe oraz stwarza miejsce dla przeszczepionych komórek krwiotwórczych, Czynniki wzrostu G-CSF oraz Prelixafor wprowadzają zmiany w mikrośrodkowisku szpiku, dochodzi do zaburzenia osi funkcjonalnej CXCR-4 - SDF-1, co w konsekwencji prowadzi do krótkotrwałego przejścia KK ze szpiku do krwi obwodowej. W przypadku zdrowych dawców największy wyrzut komórek następuje po około 5 dniach przyjmowania czynnika wzrostu. Natomiast w przypadku mobilizacji czynnikiem wzrostu w skojarzeniu z chemioterapią u pacjentów, pobranie następuje po osiągnięciu we krwi obwodowej 5-20 komórek CD34+/ μ l. Liczba komórek CD34+ we krwi obwodowej jest oceniana jako iloczyn odsetka prekursorów CD34+ oraz liczby leukocytów we krwi obwodowej pacjenta. Moment osiągnięcia wymaganej do przeprowadzenia leukaferazy wartości określającej liczbę komórek zależy od rozpoznania, stanu ogólnego pacjenta, stopnia wyniszczenia szpiku, jednakże jest to zwykle około 5-10 doby od rozpoczęcia mobilizacji [18, 20].

1.4.3 Sposób pozyskania komórek krwiotwórczych - rodzaj separatora komórkowego

Istotną kwestią mającą kluczowe znaczenie dla jakości materiału komórkowego jest sposób pozyskania komórek krwiotwórczych. Procedurę leukaferazy przeprowadza pielęgniarka bądź pielęgniarz posiadający uprawnienia, pod nadzorem lekarza. Obecnie najczęściej stosowanym źródłem komórek krwiotwórczych jest mobilizowana krew obwodowa. Materiał pozyskuje się przy użyciu separatorów komórkowych. Obecnie na rynku wyróżniamy ich kilka rodzajów. Do niedawna najczęściej stosowany był separator COBE Spectra. Jest to urządzenie półautomatyczne, które nie posiada sensora optycznego i wymaga ręcznego wprowadzania danych. Drugie urządzenie, obecnie najczęściej używane to Spectra Optia, która posiada optyczny, zautomatyzowany interfejs. Spectra Optia pozwala na modyfikację pobrania w celu zwiększenia wydajności zbiórki. Urządzenie posiada dwa programy służące do kolekcji komórek jednojądrowych; MNC (ang. *mononuclear cell collection*; zbiórka komórek jednojądrowych;) i program do ciągłej kolekcji CMNC (ang. *continuous mononuclear cell collection* ciągła zbiórka komórek jednojądrowych;). Program CMNC pozwala na ciągłą zbiórkę, bez cyklicznych wyrzutów i jest zbliżony do programu separatora COBE Spectra [31, 32].

Na jakość pozyskanego materiału w przypadku kolekcji komórek wpływa wiele czynników. Jednym z nich jest objętość określana w mililitrach, która ma istotne znaczenie dla bankowania komórek krwiotwórczych. Zbyt duża powoduje konieczność redukcji osocza w celu krioprezerwacji. W przypadku pozyskiwania materiału od dawców do allogenicznej transplantacji istotny jest stopień zanieczyszczenia materiału krwinkami czerwonymi [33]. Wysoka wartość hematokrytu i duża niezgodność grupowa krwi między dawcą a biorcą stwarza konieczność przeprowadzenia preparatyki pozwalającej przygotować produkt bezpieczny do podania pacjentowi. Zgodnie z literaturą, w przypadku preparatu zawierającego powyżej 20 ml erytrocytów konieczne jest przeprowadzenie ich redukcji. Przetoczenie większej objętości erytrocytów może skutkować hemolizą, ostrą niewydolnością nerek, a w konsekwencji śmiercią pacjenta [34]. Kolejnym ważnym aspektem jest zanieczyszczenie materiału płytkami krwi. Wysoka zawartość płytek krwi w preparacie stwarza ryzyko tworzenia skrzepów i zwykle koreluje z niższą zawartością komórek CD34+. Czas trwania aferezy nie powinien przekraczać 5 godzin i nie zaleca się, aby był powtarzany dłużej niż przez 4 kolejne dni. Zarówno wydłużanie czasu aferezy jak i liczby kolekcji nie przynosi zazwyczaj korzystnych efektów. Pionierskim i bardzo użytecznym rozwiązaniem ostatnich lat jest badanie próby materiału w trakcie trwania leukaferazy. Pozwala ona na skrócenie czasu kolekcji w przypadku pozyskania odpowiedniej liczby komórek przed zaprogramowanym czasem zakończenia zbiórki, bądź wydłużenia jej w celu uniknięcia konieczności przeprowadzenia leukaferazy kolejnego dnia.

Przed podjęciem decyzji o rozpoczęciu kolekcji komórek konieczne jest sprawdzenie liczby leukocytów i odsetka prekursorów CD34+ we krwi obwodowej pacjenta. Z literatury wynika, że, jeżeli iloczyn liczby leukocytów i odsetka prekursorów CD34+ wynosi mniej niż 10 komórek/ μ l zbiórka jest zazwyczaj nieefektywna. Wtedy sprawdzenie liczby prekursorów jest przeprowadzane kolejnego dnia, aż do osiągnięcia odpowiedniej liczby komórek. W momencie, gdy przez kolejnych kilka dni nie osiągnie się poziomu 10 komórek/ μ l wtedy najczęściej lekarz podejmuje decyzję o zastosowaniu Prelixaforu w celu uzyskania skutecznej mobilizacji [18].

1.4.4 Warunki transportu

Proces dostarczenia materiału z ośrodka pobierającego do transplantującego jest bardzo istotnym elementem mającym wpływ na jakość materiału, a w konsekwencji

powodzenie przeszczepienia. Po pozyskaniu komórek krwiotwórczych powinny być one dostarczone do banku komórek w możliwie jak najkrótszym czasie. Materiał przeznaczony do przeszczepienia powinien zawsze trafić do banku komórek skąd dalej przekazywany jest do transplantacji choremu. Obecnie przyjmuje się, iż czas od pobrania do przeszczepienia w przypadku mobilizowanej krwi obwodowej, nie powinien przekraczać 72h, a w przypadku szpiku 48h. Maksymalny czas od pozyskania komórek do krioprezerwacji, w celu zachowania wysokich parametrów ilościowo-jakościowych powinien wynosić 48h [35, 36, 37]. Natomiast zalecana temperatura transportu zazwyczaj zawiera się w zakresie 2-8°C, niektóre ośrodki transplantacyjne transportują szpik kostny w temperaturze pokojowej [38]. Oprócz czasu i temperatury znaczenie ma również sposób transportu. Transport lotniczy i związane z nim różnice ciśnień mogą niekorzystnie wpływać na jakość produktu. Podczas transportu wymagana jest kontrola i monitorowanie temperatury. Istotne są również dokumenty potwierdzające zachowanie wymaganych warunków transportu.

Jeśli ośrodek pobierający i przeszczepiający znajdują się w innych budynkach bądź nawet krajach transport musi odbywać się na ściśle określonych zasadach. Kurier zajmujący się transportem jest odpowiednio przeszkolony. Fakt przeszkolenia powinien być udokumentowany. W momencie odbioru materiału z ośrodka pobierającego kurier rozpoczyna monitorowanie temperatury i wprowadza niezbędne informacje do karty transportu, którą wypełnia regularnie, wpisując aktualną temperaturę w pojemniku transportowym. Przy odbiorze materiału musi być obecna również osoba z banku komórek bądź inny pracownik z tego ośrodka upoważniony do odbioru, który sprawdzi tożsamość kuriera i razem z nim dokona weryfikacji danych widniejących na pojemniku z materiałem transplantacyjnym. Warunki transportu, zarówno czas jak i temperaturę, określa ośrodek przeszczepiający i kurier powinien ich ściśle przestrzegać. Pojemnik transportowy powinien być wcześniej zwalidowany, ważne jest, by nie był on zbyt duży i ciężki. Materiał transplantacyjny powinien być przez cały czas z kurierem, który odpowiada za jego kontrolę. Po dostarczeniu materiału do ośrodka przeszczepiającego dane na pojemniku i dokumentach zostają zweryfikowane przez pracownika tego ośrodka. Obecnie, dzięki rozwiniętej bazie dawców na całym świecie, transport odbywa się nie tylko między krajami, ale również między kontynentami i jest nieodłącznym elementem allogenicznej transplantacji [39]. Wszystkie etapy transportu, procesy objęte systemem zapewnienia jakości i dotyczące warunków transportu są dokumentowane. Umożliwia to śledzenie losów preparatów komórkowych od pobrania do przeszczepienia choremu.

1.5 Czynniki wpływające na jakość pozyskanego materiału komórkowego – po dostarczeniu do banku komórek

Po pozyskaniu i przekazaniu materiału do banku komórek zostaje on poddany ocenie. Praca większości banków odbywa się w systemie zamkniętym przy użyciu zgrzewarek do jałowego łączenia drenów w pomieszczeniach o podwyższonym reżimie sanitarnym. Praca w systemie otwartym jest możliwa tylko w przypadku pomieszczeń posiadających klasę czystości „A”. Utrzymanie takiej jednostki jest bardzo kosztowne. Personel banku po odpowiednim przygotowaniu do pracy, założeniu czepka, fartucha ochronnego oraz maski, sprawdza wzrokowo jakość materiału, szczelność drenów. Następnie oceniana jest objętość preparatu oraz komórkowość. Liczbę komórek jednojądrowych ocenia się zwykle przy użyciu analizatora hematologicznego. Najważniejszym parametrem pozwalającym na ocenę ilościową jest liczba komórek zawierających antygen CD34+. Jest to antygen powierzchniowy obecny na najmłodszych komórkach, również komórkach krwiotwórczych. Ocena prowadzona jest z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej. Ekspresja antygenu CD34+ zmniejsza się wraz z dojrzewaniem komórek czyli za najmłodsze uważa się komórki, które wykazują najsilniejszą ekspresję. Cytometria przepływowa pozwala na ocenę komórek pod względem cech morfologicznych, ich wielkości i ziarnistości, a także na ocenę fenotypu przy wykorzystaniu zjawiska fluorescencji. Jest metodą laserową służącą do szybkiej analizy ekspresji antygenu na powierzchni komórki [40, 41, 42].

1.5.1 Objętość preparatu komórek krwiotwórczych

W zależności od rodzaju użytego separatora komórkowego oraz zastosowanej procedury pozyskania komórek mamy do czynienia z preparatami o różnej objętości. Można zastosować protokół standardowy bądź wysokoobjętościową leukaferęzę, która jest szansą na zwiększenie wydajności zbiórki, a tym samym zmniejszenie liczby kolekcji i obniżenie narażenia pacjenta na konieczność przyjmowania czynnika wzrostu w kolejnych dniach. Minusem tej metody jest ryzyko wystąpienia hipokalcemii u pacjenta związanej z zastosowaniem większej niż zwykle objętości antykoagulantu koniecznego do przeprowadzenia zabiegu leukaferęzy, zazwyczaj jest to ACD-A

(cytrynian dekstrozy; ang. *citrate dextrose A*). Dlatego bardzo istotne jest, aby podczas całego zabiegu pacjent był pod stałą kontrolą wykwalifikowanej kadry medycznej, przeszkolonej w zakresie przeprowadzania leukaferazy [43].

Postępowanie z materiałem przekazanym do banku komórek zależy od jego objętości. W przypadku zastosowania leukaferazy wysokoobjętościowej ilość uzyskanego materiału jest większa niż przy wykorzystaniu standardowej procedury. W przypadku dużej objętości pozyskanego preparatu liczba krioprezerwowanych pojemników byłaby duża, a co za tym idzie wzrasta również objętość krioprotektanta podanego pacjentowi. DMSO (dimetylosulfotlenek; ang. *dimethyl sulfoxide*), najczęściej stosowany krioprotektant, nie jest obojętny dla organizmu. Dlatego, aby zminimalizować ilość krioprotektanta, który będzie w późniejszym czasie podawany pacjentowi wraz z przeszczepem, preparat musi być poddany redukcji osocza przed krioprezerwacją [44].

1.5.2 Stężenie komórek jednojądrowych

Na jakość materiału transplantacyjnego wpływa również stężenie komórek w przeszczepie. Nie powinno być ono wyższe niż $200 \times 10^9/l$. Wyższe stężenie komórek może skutkować zmniejszeniem ich żywotności. Im niższe stężenie komórek w materiale, tym wyższa ich żywotność. Należy przestrzegać zasady, że nie powinno się jednak zbyt rozcieńczać materiału, gdyż stwarza to konieczność redukcji objętości w przypadku krioprezerwacji, aby zminimalizować objętość użytego krioprotektanta. Stężenie komórek powyżej $300 \times 10^9/l$ skutkuje znacznym spadkiem ich żywotności, szczególnie jeśli konieczne jest jego przechowywanie. Dotyczy to przede wszystkim preparatów pochodzących od dawców niespokrewnionych, które są transportowane z innych ośrodków [43]. Do rozcieńczenia materiału o wysokim stężeniu komórek stosuje się osocze autologiczne, bądź osocze dawcy w przypadku pobrania od dawcy niespokrewnionego. Osocze jest naturalnym środowiskiem występowania komórek krwiotwórczych i zawiera wszystkie niezbędne substancje zapewniające ich prawidłowe funkcjonowanie i odżywienie. Niekorzystna jest wysoka zawartość granulocytów, czyli dojrzałych komórek, która skutkuje wystąpieniem zjawiska „clumpingu” czyli spontanicznej agregacji komórek, która znacznie obniża zawartość komórek CD34+ i CFU-GM w materiale. Zjawisko spontanicznej agregacji komórek w materiale po rozmrożeniu jest znacznie bardziej nasilone niż w świeżym produkcie. Jest również bardziej widoczne w preparatach, w których stężenie komórek przewyższa wartość

500x10⁹/l [45]. Dodatkowo wysoka zawartość dojrzałych granulocytów w krioprezerwowanym materiale może być przyczyną wystąpienia reakcji niepożądanych podczas infuzji u pacjenta, są to m.in. reakcje alergiczne, zaburzenia oddychania, zaburzenia rytmu serca [46, 47].

1.5.3 Warunki krótkoterminowego przechowywania komórek krwiotwórczych

Materiał zawierający krwiotwórcze komórki macierzyste po wstępnej ocenie jest przechowywany do czasu transplantacji. Wyróżniamy krótkoterminowe i długoterminowe przechowywanie KK. Mianem krótkoterminowego przechowywania określa się czas od momentu pozyskania krwiotwórczych komórek do przeszczepienia materiału pacjentowi, bez krioprezerwacji. Zgodnie z piśmiennictwem czas od momentu pozyskania do podania nie powinien być dłuższy niż 72h w przypadku komórek krwiotwórczych pozyskanych z mobilizowanej krwi obwodowej. Jednakże, aby zachować jak najwyższe parametry ilościowo-jakościowe materiał przeznaczony do krioprezerwacji powinien być zamrożony w ciągu 48h od pozyskania [37]. Krótkoterminowe przechowywanie jest bardzo istotne zarówno w przypadku komórek autologicznych jak i allogenicznych, szczególnie, gdy ośrodki, pobierający i przeszczepiający, są od siebie znacznie oddalone. Na jakość KK ma wpływ wiele czynników, również to w jaki sposób materiał będzie transportowany. Istotna jest także temperatura przechowywania materiału po pobraniu. Zazwyczaj materiał transplantacyjny przechowuje się w temperaturze od 2°C do 8°C. Oprócz przechowywania materiał po dostarczeniu do banku jest poddawany preparatyce w temperaturze pokojowej, która również może spowodować zmiany ilościowo-jakościowe w produkcie. Niektóre badania mówią o tym, iż przechowywanie szpiku kostnego w temperaturze pokojowej nie spowodowało obniżenia żywotności ani komórkowości materiału. Dodatkowo, przechowywanie szpiku w temperaturze pokojowej po pozyskaniu pozwala na eliminację drobnoustrojów skórnych, które stanowią częste zanieczyszczenie po pobraniu [48]. W przypadku PBSC (komórki macierzyste pozyskane z mobilizowanej krwi obwodowej; *ang. peripheral blood stem cells*) komórki są bardziej wrażliwe i wiele doniesień mówi, iż najbardziej odpowiednia jest temperatura przechowywania w zakresie od 2°C do 8°C. Natomiast komórki pozyskane z krwi pępowinowej są bardziej odporne na długość czasu przechowywania po pozyskaniu do momentu zamrożenia, mniejsze różnice w żywotności stwierdza się

również porównując różne temperatury przechowywania [49]. Parametrem, który jest najbardziej wrażliwy i ulega największemu spadkowi podczas przechowywania jest potencjał proliferacyjny komórek krwiotwórczych [39, 50]. Długotrwałe przechowywanie, szczególnie w wyższej temperaturze (20°C), skutkuje spadkiem pH, co może doprowadzić do uszkodzenia organelli komórkowych [35, 51]. Na jakość materiału transplantacyjnego ma wpływ wiele czynników, natomiast warunki przechowywania, czyli czas i temperatura od momentu pozyskania do krioprezervacji, są w tym aspekcie kluczowe i mają ogromny wpływ na powodzenie transplantacji [52, 53]. JACIE (ang. *Joint Accreditation Committee-ISCT*; Wspólna Komisja Akredytacyjna) oraz WMDA, czyli organizacje ustalające wytyczne odnośnie zasad funkcjonowania banków komórek zalecają, by każdy ośrodek zajmujący się przetwarzaniem krwiotwórczych komórek macierzystych przeznaczonych do transplantacji stworzył i zwalidował wewnętrzny system przechowywania materiału opierając się na własnym doświadczeniu [54, 55]. WMDA w 2015 roku wydało zalecenie dotyczące przechowywania produktów PBSC i szpiku, które mówią o tym, iż jeżeli przechowywanie nie przekracza 12 h może się odbywać w zakresie temperatur 2-24°C. Powyżej 12h zalecana jest temperatura poniżej 12°C. Warunki przechowywania mogą istotnie wpływać na skład ilościowy oraz jakość produktu, co ma swoje odzwierciedlenie w obrazie klinicznym. Przeszczepienie materiału o niższej żywotności wiąże się z wyższą śmiertelnością oraz większym ryzykiem wystąpienia GvHD u pacjenta [43].

1.5.4 Rodzaj użytego krioprotektanta

Aby komórki krwiotwórcze mogły być zamrożone i przechowywane przez dłuższy okres (kilka miesięcy bądź lat) konieczne jest użycie krioprotektanta. Zapobiega on uszkodzeniu komórki w trakcie zamrażania i pozwala na zachowanie jej funkcjonalności po rozmrożeniu. Do powszechnie stosowanych krioprotektantów zaliczamy dimetylosulfotlenek, który jest stosowany w stężeniu 5% lub 10% [44]. Rzadziej stosowane środki krioprotekcyjne to glicerol i HSA (ludzka albumina; ang. *human serum albumin*). Dimetylosulfotlenek to organiczny związek chemiczny z grupy sulfotlenków, w ludzkim organizmie powoduje rozpad erytrocytów i ulega metabolizmowi do sulfidu dimetylowego [56]. DMSO w stężeniu 10% jest najczęściej stosowanym krioprotektantem, wnika do wnętrza komórki, wiąże wodę zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz komórki, ogranicza wzrost ciśnienia osmotycznego

i spowalnia tworzenie kryształów lodu, które uszkodzają organelle komórkowe. Krioprotektanty wewnątrzkomórkowe powodują przekształcenie płynu wewnątrzkomórkowego z postaci płynnej do szklistej, bez tworzenia kryształów. DMSO wpływa toksycznie na komórki, dlatego dąży się do zminimalizowania jego stężenia w mieszaninie kriochronnej. Szkodliwe działanie DMSO na komórki wynika głównie z wywoływania przez niego szoku osmotycznego [57]. DMSO działa również toksycznie na pacjentów. Do efektów ubocznych możemy zaliczyć nudności wymioty, działanie kardiotoksyczne, problemy z oddychaniem. Dlatego podejmowano próby jego eliminacji przed transplantacją. Materiał przepłukiwano, odwirowywano i ponownie zawieszano w soli fizjologicznej. Niestety te działania zmniejszają żywotność KK. Procedura odmycia DMSO może być przeprowadzona tylko w przypadku dysponowania odpowiednią liczbą komórek CD34+/kg m.c. pacjenta oraz większą liczbą krioprezerwowanych pojemników. W niektórych ośrodkach stosuje się niższe stężenia DMSO np. 5% lub 7,5%, jednakże każda metoda stosowana w danym ośrodku musi być poparta praktyką i przeprowadzoną procedurą walidacji procesu z użyciem krioprotektanta o określonym stężeniu. Dobrym rozwiązaniem jest również łączenie DMSO z krioprotektantami niepenetrującymi. Aby przygotować mieszaninę kriochronną zwykle 100% DMSO zawiesza się w osoczu autologicznym do uzyskania stężenia 20%, a następnie łączy z równą objętością zawiesiny komórek i ostatecznie otrzymuje się roztwór zawierający 10% DMSO. Ponieważ podczas dodawania DMSO zachodzi reakcja egzotermiczna proces ten należy przeprowadzać w łaźni lodowej. Po dodaniu roztworu krioprotekcyjnego materiał umieszcza się w komorze do zamrażania. Oprócz osocza autologicznego do przygotowania mieszaniny kriochronnej można użyć albuminy [58]. Ważne jest, aby krioprezerwacja odbywała się stopniowo. Zapobiega to uszkodzeniu komórek i zapewnia wysoką żywotność KK [59, 67].

1.5.5 Sposób krioprezerwacji

Jeśli materiał ma być przechowywany przez dłuższy okres (kilka miesięcy bądź lat) musi zostać poddany krioprezerwacji. Proces ten ma na celu zamrożenie komórek z zachowaniem integralności strukturalnej i funkcjonalnej komórki. Wyróżniamy dwie metody zamrażania, kontrolowane i niekontrolowane. Proces programowanego, kontrolowanego zamrażania odbywa się stopniowo. Obniżanie temperatury następuje z szybkością 1-2°C/min. i trwa około godziny. Powolne schładzanie materiału umożliwia

usunięcie wody wewnątrzkomórkowej przed jej przejściem w stan stały, co pozwala zapobiec uszkodzeniu komórek poprzez tworzenie lodu wewnątrzkomórkowego. Zgodnie z literaturą, po osiągnięciu temperatury -40°C komórki krwiotwórcze są już znacznie bardziej odporne na uszkodzenia, natomiast po uzyskaniu temperatury -100°C materiał umieszcza się w zbiorniku, w parach ciekłego azotu. Metoda ta jest kosztowna i czasochłonna, ale pozwala zachować najwyższą jakość materiału transplantacyjnego. [37] Drugi sposób polega na umieszczeniu materiału w zamrażarce w temperaturze -80°C bezpośrednio po dodaniu do niego mieszaniny krioprotekcyjnej. Następnie po upływie 24 godzin, ustabilizowaniu temperatury, materiał może być przeniesiony do par ciekłego azotu. Zgodnie z literaturą jest to metoda bezpieczna i akceptowana, jednakże nie pozwala na zachowanie tak dobrych parametrów ilościowo-jakościowych materiału jak programowane zamrażanie. Przechowywanie KK w -80°C powoduje utratę integralności błony komórkowej i zdolności do proliferacji już po kilku miesiącach [60, 61, 62]. Rekomendowaną metodą krioprezerwacji jest metoda kontrolowanego zamrażania [67].

1.5.6 Warunki przechowywania długoterminowego

Po zamrożeniu komórek umieszcza się je w przeznaczonych do tego celu zbiornikach. Najczęściej, długoterminowo, KK przechowuje się w parach ciekłego azotu w temperaturze około -160°C . Przechowywanie preparatów w zbiornikach magazynowych zasilanych w ciekły azot jest kosztowne, wymaga ciągłej kontroli poziomu ciekłego azotu w zbiorniku zasilającym. Dodatkowo pomieszczenie w którym znajdują się zbiorniki musi być odpowiednio wentylowane oraz zaopatrzone w czujniki poziomu tlenu, gdyż zbyt duże stężenie azotu w powietrzu stwarza bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia i życia osób przebywających w tym pomieszczeniu. Plusem przechowywania materiału w zbiornikach zasilanych ciekłym azotem jest długotrwałe utrzymywanie temperatury, nawet w przypadku awarii zasilania. Bez dostępu do ciekłego azotu wysokiej jakości zbiornik utrzymuje prawidłową temperaturę przez kilka dni co pozwala na usunięcie usterki i zapewnia bezpieczeństwo przechowywanych preparatów nawet w dni wolne od pracy. Krwiotwórcze komórki macierzyste mogą być również przechowywane bezpośrednio w ciekłym azocie. Niestety istnieje wtedy ryzyko kontaminacji materiału. Może dojść do rozprzestrzenienia się wirusów między preparatami znajdującymi się w jednym zbiorniku. Obecnie stosuje się praktykę gromadzenia KK na dwie lub więcej transplantacji, dlatego tak ważne jest właściwe

przechowywanie materiału, gdyż może być on używany po wielu latach. Obecnie nie znamy maksymalnego czasu przechowywania z zachowaniem parametrów ilościowo-jakościowych materiału pozwalających na przeprowadzenie przeszczepienia. Niektóre badania donoszą, iż jest to nawet 19 lat [63]. Czas, po upływie którego materiał przeszczepowy można zutylizować jest kwestią dyskusyjną. Są ośrodki, które utylizują materiał po 6 miesiącach od pozyskania, inne przechowują go nawet 20 lat. Wiele ośrodków przechowuje przeszczepy do śmierci pacjenta [47]. Preparaty mogą być poddane utylizacji również w przypadku zbyt niskiej liczby komórek krwiotwórczych bądź zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Wtedy zespół banku komórek po konsultacji z lekarzem podejmuje decyzję o usunięciu takiego preparatu.

Rzadziej stosowany sposób to przechowywanie przeszczepu w zamrażarce w temperaturze -80°C . Mówi się, iż maksymalny czas przechowywania w takich warunkach wynosi 6 miesięcy. Dużym minusem jest to, że w przypadku awarii zamrażarki niskotemperaturowej do wzrostu temperatury dochodzi w ciągu kilkudziesięciu minut. Wtedy zabezpieczeniem jest system awaryjnego zasilania CO_2 , który pozwala na utrzymanie wymaganej temperatury [37,44, 64,].

1.5.7 Sposób rozmrażania

Kolejnym newralgicznym punktem procesu przetwarzania materiału transplantacyjnego jest rozmrażanie. Liczne badania eksperymentalne wskazują, iż dimetylosulfotlenek, mimo, iż jest krioprotektantem, po rozmrożeniu działa toksycznie na komórki. Dlatego tak ważne jest, by czas od rozmrożenia materiału do podania go pacjentowi był możliwie jak najkrótszy [58].

Obecnie materiał rozmraża się najczęściej w łaźni wodnej w temperaturze 37°C aż do otrzymania jednorodnej zawiesiny. Niewątpliwie pewnym zabezpieczeniem KK w przypadku rozmrażania materiału w łaźni wodnej jest zastosowanie jałowego pojemnika zewnętrznego, wtedy materiał nie ma bezpośredniego kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym i jest zabezpieczony w przypadku uszkodzenia. Ogranicza także zagrożenie przeniesienia ewentualnego zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Drugą również stosowaną opcją jest rozmrażanie na sucho z zastosowaniem urządzenia z wkładami grzewczymi.. Rozmrażanie „na sucho” jest procesem przebiegającym jednostajnie, w sposób kontrolowany, a preparat jest mieszany przez cały czas do momentu całkowitego rozmrożenia. Średni czas rozmrażania

w przypadku zastosowania łaźni wodnej jest krótszy niż metodą „na sucho”. Procedura rozmrażania może się odbywać w bankach komórek, bądź bezpośrednio przy łóżku pacjenta. Rozmrażanie w bankach komórek umożliwia szybką reakcję w przypadku nieszczelności pojemnika z materiałem, bądź jego uszkodzenia, natomiast przeprowadzenie tej procedury przy łóżku pacjenta pozwala na szybką infuzję [65, 66].

1.6. Ilościowo-jakościowa ocena materiału transplantacyjnego

Aby materiał transplantacyjny mógł być wykorzystany do przeszczepienia konieczna jest jego kompleksowa ocena. Każdorazowo, przed rozpoczęciem preparatyki w banku komórek ocenia się status mikrobiologiczny materiału. Następnie dokonuje się oceny wizualnej, jednorodności mieszaniny, braku skrzepów. Kolejnym etapem jest obliczenie objętości, która jest iloczynem wagi i gęstości preparatu komórek krwiotwórczych, liczby komórek jednojądrowych oraz CD34+ i ich żywotności ocenianej z użyciem 7-AAD. Po zakończeniu czynności preparatywnych ponownie ocenia się status mikrobiologiczny materiału. Następnie preparaty przeznaczone do długoterminowego przechowywania poddaje się procesowi krioprezerwacji.

Przed podjęciem decyzji o podaniu zamrożonego materiału pacjentowi konieczne jest sprawdzenie jego jakości. W tym celu należy rozmrozić pilotkę, czyli reprezentatywną próbkę KK poddaną tym samym manipulacjom i przechowywaną w tych samych warunkach co materiał transplantacyjny. Po rozmrożeniu analizuje się żywotność komórek metodą mikroskopową z błękitem trypanu oraz żywotność komórek CD34+ przy użyciu cytometrii przepływowej z 7-AAD. W sytuacjach wątpliwych, przy niskiej żywotności komórek, można założyć hodowlę komórkową, aby ocenić potencjał proliferacyjny. Dopiero po takiej ocenie materiał transplantacyjny może zostać zakwalifikowany do podania pacjentowi.

1.6.1 Liczba i żywotność komórek jednojądrowych

Podstawowymi parametrami pozwalającymi na ocenę ilościową materiału transplantacyjnego jest liczba komórek jednojądrowych. Do tej analizy służy analizator hematologiczny. Wiedza na temat liczby komórek jednojądrowych jest podstawową informacją, wyjściową do końcowego obliczenia liczby komórek CD34+ w materiale. Natomiast całkowita liczba komórek CD34+ jest najważniejszym czynnikiem

predykcynym wpływającym na szybkość rekonstytucji u pacjenta [67]. Bardzo istotna jest również ocena jakościowa preparatu, do której zaliczamy m.in. żywotność komórek jednojądrowych. Do oceny żywotności komórek możemy wykorzystać metodę mikroskopową, w której stosuje się najczęściej błękit trypanu. Analiza ta wykorzystuje do oceny mikroskop świetlny niskiej rozdzielczości oraz hemocytometr, który służy do zliczenia odsetka komórek żywych [68]. Do rzadziej używanych barwników zaliczamy oranż akrydyny, jodek propidyny i czerwień obojętną. Ocena żywotności komórek krwiotwórczych z użyciem błękitu trypanu jest uznana za złoty standard. Metoda mikroskopowa wykorzystuje zjawisko utraty integralności błony komórkowej w wyniku śmierci komórki, wtedy barwnik może wnikać do jej wnętrza i zabarwić cytoplazmę organelle komórkowe i jądro. Ocena żywotności z błękitem trypanu jest stosunkowo szybka i prosta w wykonaniu, jednakże posiada wiele wad. Jest to metoda subiektywna i niewalidowana, nie pozwala również na ocenę rodzaju śmierci komórki, apoptozy, czy nekrozy, nie umożliwia identyfikacji komórek, w których apoptoza jest na wczesnym etapie. W próbce barwnik chłona również komórki bezjądrowe oraz artefakty, które mogą zaniżać wynik żywotności. Jednakże ocena żywotności przy użyciu błękitu trypanu nadal pozostaje najlepszą i szybką metodą oceny materiału transplantacyjnego [69, 70]. Jest uzupełnieniem oceny za pomocą metody cytometrii przepływowej.

1.6.2 Odsetek i żywotność komórek CD34+

Komórki macierzyste cechuje występowanie na ich powierzchni specyficznych białek CD (antygen różnicowania komórkowego *ang. cluster of differentiation*). Komórka krwiotwórcza morfologicznie przypomina mały limfocyt. KK, nie wykazująca charakterystycznych cech cytomorfologicznych była nie do odróżnienia pod mikroskopem od innych niedojrzałych komórek, dlatego przełomowym momentem w jej identyfikacji było zastosowanie cytometrii przepływowej. Metoda ta polega na reakcji przeciwciał monoklonalnych, skoniugowanych z fluorochromami, z określonymi determinantami antygenowymi obecnymi na komórkach. KK wykazuje obecność antygenu CD34, CD59 CD117 oraz CD113. Antygen CD34 pozwala odróżnić komórki hematopoetyczne od niehematopoetycznych [5, 71]. Ekspresja antygenu CD34 zmniejsza się wraz z dojrzewaniem komórek. KK jest multipotencjalna, co oznacza, że może różnicować się w więcej niż jedną linię rozwojową [3, 40]. Najważniejszym

parametrem pozwalającym ocenić przydatność materiału transplantacyjnego do odtworzenia hematopoezy jest liczba komórek CD34+ na kilogram masy ciała biorcy. Wartość ta jest wyrażona jako iloczyn odsetka komórek CD34+ i całkowitej liczby komórek jądrowych w produkcie leukaferozy podzielonej na masę ciała biorcy. Uznaje się, iż wymagana liczba komórek to $2 \times 10^6 \text{CD34+}/\text{kg m.c.}$ Stwierdzono ścisłą korelację między liczbą komórek CD34+ w preparacie, a szybkością rekonstytucji granulopoezy i trombopoezy u pacjenta [37].

Oprócz oceny liczby komórek CD34+ sprawdzana jest również ich żywotność. Metoda oceny żywotności polega na reakcji antygenów powierzchniowych z dodanymi do zawiesiny przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami. Odczyt następuje po inkubacji, w cytometrze przepływowym. Najczęściej wykorzystywanym barwnikiem jest 7- aminoaktynomycyna-D, która wiąże się pomiędzy guaniną i cytozyną w podwójnej nici DNA. Dotyczy to komórek nekrotycznych oraz będących w zaawansowanym stadium apoptozy. Do innych barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych do oceny żywotności komórek zaliczamy SYTO oraz oranż akrydyny. Barwnik SYTO wykazuje wysoką czułość dotyczącą zmian w strukturze chromatyny, jako jeden z objawów apoptozy. W miarę postępu apoptozy fluorescencja SYTO zanika. Metoda ta jest obiektywna, szybka, cechuje się dużą dokładnością i powtarzalnością. Ważną cechą cytometrii jest jej standaryzacja, która pozwala na uzyskanie zbliżonych wyników we wszystkich laboratoriach wykonujących analizy. Jej wadą jest wysoki koszt badania. Cytometria przepływowa pozwala na ocenę rodzaju śmierci komórki, apoptozy czy nekrozy oraz stadium, w jakim się znajduje. Ocena żywotności jest podstawową metodą pozwalającą na określenie jakości materiału transplantacyjnego. Niewłaściwa analiza żywotności może prowadzić do braku rekonstytucji, a w konsekwencji do śmierci pacjenta. Dodatkowo wysoka zawartość martwych komórek w przeszczepie prowadzi do wielu reakcji niepożądanych u pacjenta [20, 72, 73].

1.6.3 Potencjał proliferacyjny komórek krwiotwórczych

Ocena ilościowa zawartości komórek CD34+ w materiale transplantacyjnym ma kluczowe znaczenie jednakże nie pozwala na analizę rzeczywistej funkcjonalności komórek. Do tego celu stosuje się hodowlę komórkową prekursorów CFU-GM. Po około 7 dniach inkubacji materiału w pożywce zawierającej odpowiednie cytokiny i czynniki

wzrostu ocenia się pod mikroskopem liczbę kolonii granulocytarnych, które odzwierciedlają ilość CFU-GM zawartą w materiale transplantacyjnym. Udowodniono, że liczba CFU-GM koreluje z szybkością rekonstytucji hematopoezy. Nawet w przypadku małej liczby komórek CD34+ w materiale przy wysokiej liczbie CFU-GM dochodziło do szybkiej odnowy krwiotworzenia. Metoda ta jako jedyna pozwala na ocenę funkcjonalną przeszczepu. Jednakże długi czas oczekiwania i brak standaryzacji powodują, iż nie jest rutynowo stosowana. Hodowla komórkowa pozwala na ocenę potencjału proliferacyjnego komórek, czyli ilościową ocenę funkcji biologicznej. Przyjmuje się, że materiał powinien zawierać $>1 \times 10^5$ CFU-GM/kg m.c. biorcy. Taka ilość wiąże się z pomyślnym wynikiem transplatacji, choć jak wiadomo, im wyższy potencjał proliferacyjny, tym szybsza rekonstytucja [74, 75].

Czas szerzenia się pandemii SARS-CoV-2 wprowadził wiele zmian w każdej dziedzinie życia. Problem z dostępnością dawców, trudności z przemieszczaniem się oraz zamknięte granice spowodowały znaczne utrudnienia w skoordynowaniu pobrania komórek krwiotwórczych i ich podania pacjentowi. NMDP w marcu 2020 roku wydało zalecenie poddawania krioprezerwacji komórek krwiotwórczych pozyskanych od dawców allogenicznych. W przypadku produktów pozyskiwanych w Europie dla biorców leczonych w Australii bądź Ameryce Północnej materiał był pozyskiwany i poddawany krioprezerwacji w Europie. Obecnie NMDP zaleca w przypadku pozyskiwania materiału od zaszczepionych dawców przeprowadzenie procedury z użyciem świeżego produktu. Sugeruje jednak konieczność posiadania alternatywnego dawcy w przypadku wystąpienia jakichkolwiek komplikacji. Przed okresem pandemii krioprezerwacja obejmowała głównie produkty autologiczne. Konieczność zamrażania również materiałów pochodzących od dawców allogenicznych, spowodowało znaczne obciążenie banków komórek [76, 77, 78]. Bardzo istotny dla jakości produktu jest transport komórek, szczególnie jeśli materiał ma być poddany zamrożeniu. Poznanie zmian jakie zachodzą w zakresie ilościowym oraz jakościowym preparatu komórek krwiotwórczych w zależności od czasu transportu jest niesłychanie ważne. Jednakże w przypadku preparatów allogenicznych niemożliwe do oceny, gdyż produkt otrzymujemy najczęściej po 24 lub 48 h od pozyskania. Niniejsza praca doktorska pozwoliła prześledzić zmiany jakie zachodzą w produkcie podczas przechowywania w zależności od czasu i temperatury.

Transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych jest nieodłącznym elementem leczenia chorób hematologicznych z użyciem wysokodawkowej chemioterapii. Bardzo ważne jest, by materiał transplantacyjny był jak najwyższej

jakości. Ocena ilościowo-jakościowa KK przed podaniem pacjentowi zapewnia bezpieczeństwo przeprowadzanej procedury. Na jakość materiału transplantacyjnego ma wpływ wiele czynników. Proces pozyskania komórek, ich stężenie w preparacie przeznaczonym do krioprezervacji, rodzaj użytego antykoagulantu, a także czas i temperatura przechowywania po pozyskaniu. Światowe organizacje, zajmujące się ustalaniem zasad postępowania z KK mówią, iż każdy ośrodek powinien sam ustalić zarówno czas jak i temperaturę przechowywania przeszczepu. Niniejsza rozprawa doktorska ma na celu określić optymalne warunki krótkoterminowego przechowywania materiału transplantacyjnego z zachowaniem najwyższych parametrów ilościowo-jakościowych. Tylko najwyższa jakość KK zapewni bezpieczeństwo przeprowadzanych transplantacji.

2. Cel pracy

Praca ma na celu optymalizację warunków pozyskiwania, przechowywania i przetwarzania od momentu pozyskania komórek krwiotwórczych do momentu ich krioprezerwacji i przechowywania po zamrożeniu. Wysoka jakość materiału transplantacyjnego ma istotne znaczenie w całej procedurze transplantacji. Wyznaczono następujące cele do realizacji:

1. Określenie wpływu rodzaju użytego separatora komórkowego na jakość pozyskanych komórek krwiotwórczych przyjmowanych przez bank komórek.

W tym celu oznaczono:

- a) objętość preparatu
- b) bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych
- c) bezwzględną liczbę komórek CD34+
- d) żywotność komórek CD34+ po rozmrożeniu

Porównano wyniki uzyskane przy użyciu separatorów komórkowych: Cobe Spectra oraz Spectra Optia.

2. Ocena wpływu preparatyki na materiał przeszczepowy. W tym celu porównano:

- a) bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych przed i po redukcji osocza
- b) bezwzględną liczbę komórek CD34+ przed i po redukcji osocza
- c) odsetek komórek CD34+ przed i po redukcji osocza
- d) żywotność komórek CD34+ przed i po redukcji osocza

3. Określenie wpływu czasu i temperatury przechowywania preparatów komórek krwiotwórczych na:

- a) odsetek komórek CD34+
- b) żywotność komórek CD34+
- c) liczbę komórek jednojądrowych
- d) żywotność komórek jednojądrowych
- e) liczbę prekursorów granulocytarno-monocytowych ocenianych przy użyciu hodowli in vitro

Oceny powyższych parametrów dokonano przed zamrożeniem materiału oraz po jego rozmrożeniu.

3. Materiał i metoda

3.1 Materiał

3.1.1 Pozyskanie materiału

Dokonano porównania materiału pochodzącego z leukaferéz przeprowadzonych u 293 pacjentów oraz dawców z Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku. Analizą objęto parametry ilościowe i jakościowe materiału przeznaczonego do transplantacji. Średnia wieku wszystkich badanych wynosiła 43 lata (tabela 1). Materiał pozyskano od chorych na szpiczaka plazmocytoowego (MM - *Multiple Myeloma*), chłoniaka nieziarnicznego (NHL - *non Hodgkin Lymphoma*) oraz chłoniaka Hodgkina (HD - *Hodgkin disease*). Leukaferézę przeprowadzono przy użyciu separatorów komórkowych: Cobe Spectra (S) oraz Spectra Optia (O). Oba separatory były używane w Klinice losowo, przy czym każda leukaferéza była przeprowadzana z zastosowaniem jednego separatora. COBE Spectra jest separatorem półautomatycznym, nie posiadającym sensora optycznego, wymagający ręcznego wprowadzania danych. Spectra Optia natomiast posiada optyczny, zautomatyzowany interfejs, pozwala na modyfikację pobrania w celu zwiększenia wydajności zbiórki. W tabeli 1 przedstawiono zestawienie dotyczące pozyskania materiału w zależności od użytego separatora komórkowego.

cechy	Charakterystyka grupy badanej			
płeć	kobiety		mężczyźni	
	125		167	
wiek [lata]	48 (25-73)		46 (23-73)	
rodzaj separatora	COBE Spectra		Spectra Optia	
płeć	kobiety	mężczyźni	kobiety	mężczyźni
	81	87	44	80
rodzaj dawcy	autologiczny	allogeniczny	autologiczny	allogeniczny
	118	50	48	76

Tabela 2. Charakterystyka grupy badanej- podział w zależności od użytego separatora komórkowego

3.1.2 Materiał poddawany redukcji osocza

Procedura redukcji osocza polega na wirowaniu preparatów komórek krwiotwórczych przy użyciu wirówki preparatywnej, a następnie usunięciu odpowiedniej objętości osocza z zastosowaniem ręcznego ekstraktora osocza. Procedura wykonywana jest w zależności od potrzeb. Analizie poddano próby autologicznych komórek krwiotwórczych pozyskanych metodą leukaferazy z mobilizowanej krwi obwodowej. Materiał pochodził od 360 pacjentów (146 kobiet i 214 mężczyzn). Redukcji osocza poddano 224 preparaty.

Cechy grupy badanej	Wartości	
liczebność	360	
wiek [lata]	57 (21-74)	
pleć K/M	146/214	
redukcja osocza	tak	nie
	224	136

Tabela 3. Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem preparatywnej redukcji osocza

3.1.3 Przechowywanie materiału po przeprowadzonej leukaferazie w różnych warunkach

Po przeprowadzonej leukaferazie materiał był przyjmowany przez Bank Komórek Macierzystych SKPP UM w Poznaniu. Jednym z głównych celów badania jest analiza parametrów ilościowo-jakościowych materiału pozyskanego w wyniku aferezy i przechowywanego w różnym czasie (24 i 48 godzin) i temperaturze (4°C i 20°C). Ocenie poddano 31 prób autologicznych komórek krwiotwórczych pozyskanych przy użyciu separatora komórkowego po uprzedniej mobilizacji, pochodzących od pacjentów leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w latach 2015-2020. Materiał pochodził od 8 kobiet i 23 mężczyzn (tabela 3). W części badawczej wykonano ponad

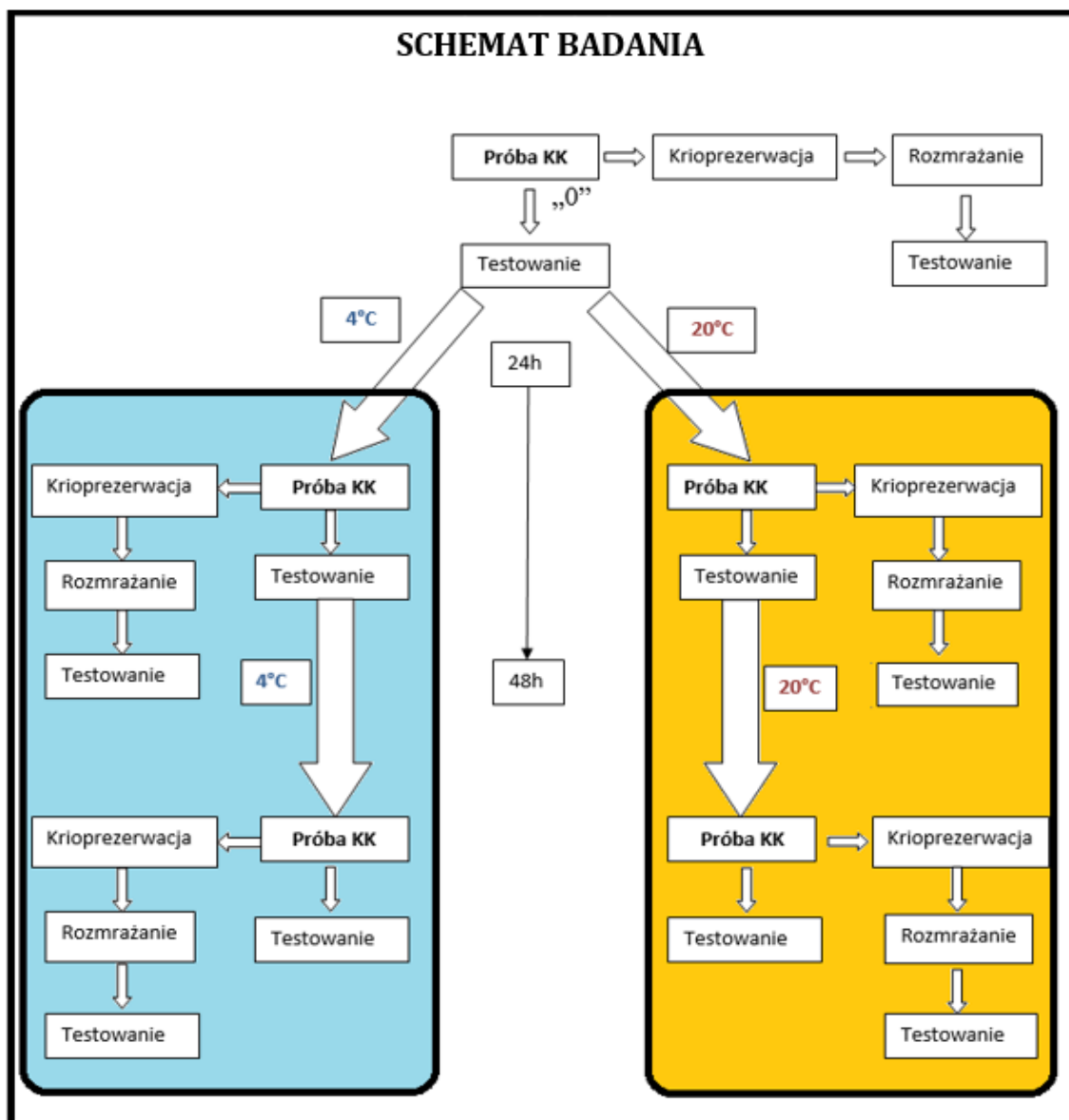
300 analiz parametrów ilościowo-jakościowych oraz założono ponad 300 hodowli komórkowych in vitro.

Poniższa tabela dotyczy charakterystyki grupy badanej w części III, dotyczącej przechowywania materiału.

Cechy	Wartości		
liczebność	31		
wiek	61 (77-43)		
pleć	kobiety	mężczyźni	
	8	22	
rozpoznanie	NHL	MM	LGM
	4	25	2

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej- różne warunki przechowywania komórek krwiotwórczych

Warianty badania wiązały się z wykonaniem oznaczeń parametrów ilościowo-jakościowych w materiale bezpośrednio przyjętym do banku oraz po 24 i 48 godzinach przechowywania. Ważnym elementem badania była również różna temperatura przechowywania: 4°C i 20°C. Za każdym razem parametry ilościowe i jakościowe (liczba komórek CD34+ i jednojądrowych, odsetek komórek CD34+, żywotność komórek CD34+ i jednojądrowych oraz potencjał klonogeny) określano na kolejnych etapach, co oznaczono na rycinie 5 jako „Testowanie”. Badania przeprowadzono na podstawie zgody Komisji Bioetycznej- Uchwała nr 46/15 z dnia 08 stycznia 2015r. Próby materiału komórkowego do badań były przechowywane zgodnie z poniższym schematem.



Rycina 4. Schemat badania

Legenda:

- | | |
|------------|--|
| Próba KK | - próba komórek krwiotwórczych pozyskanych przy użyciu separatora komórkowego przeznaczonych do analizy |
| „0” | - doba 0, czyli materiał analizowany bezpośrednio po pozyskaniu |
| Testowanie | - badanie materiału polegające na ocenie liczby komórek jednojądrzastych, liczby komórek CD34+, żywotności komórek jednojądrzastych ocenianych z błękitem trypanu, żywotności komórek CD34+ ocenie przy użyciu separatora komórkowego, ocena liczby prekursorów CFU-GM- hodowla komórkowa. |

Krioprezewacja

- zamrażanie materiału z zastosowaniem 10% DMSO przy użyciu programowanego systemu zamrażania kontrolowanego komputerowo. Cały proces trwa ok. 1h, szybkość zamrażania wynosi średnio 1°C/min. Następnie próbki umieszcza się w zbiornikach z parami ciekłego azotu w temperaturze -156°C.

Rozmrażanie

- próbki umieszczane są w łaźni wodnej w temperaturze 37°C w celu doprowadzenia do całkowitego rozpuszczenia materiału.

3.2 Metody

3.2.1 Pozyskanie materiału

Materiał KK był pozyskiwany na Oddziale Transplantacji Szpiku Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Po uprzedniej terapii mobilizującej, czyli po przeprowadzeniu właściwej do rozpoznania chemioterapii i po podaniu czynnika wzrostu wykonywano zabieg leukaferazy. Aferezy przeprowadzał zespół lekarsko-pielęgniarski pracujący na oddziale. Wykorzystano zamiennie posiadane przez Klinikę separatory komórkowe dwóch typów: COBE Spectra oraz Spectra Optia. Po zabiegu materiał przekazywano do Banku Komórek Macierzystych (BKM).



Rycina 5. Separator komórkowy- Cobe Spectra (zdjęcie własne)



Rycina 6. Separator komórkowy- Spectra Optia (zdjęcie własne)

Po zakończonej aferezie materiał był odbierany przez pracownika BKM w Pracowni Aferezy. Data, godzina i temperatura odbioru preparatu była zapisywana na odpowiednim formularzu. Po dostarczeniu materiału do Banku Komórek Macierzystych produkt był umieszczany w służbie podawczej na czas przygotowania pracownika do preparatyki. Po przyjęciu do BKM, materiał przeznaczony do testowania pobrany z głównego worka kolekcyjnego poddawano analizie w Pracowni Preparatyki Szpiku. Praca w BKM odbywała się w systemie zamkniętym przy użyciu zgrzewarki do jałowego łączenia drenów z zachowaniem zasad zwiększonego reżimu sanitarnego. Pracownik był ubrany w czepek, maseczkę i fartuch ochronny, przed wejściem do pracowni zmienia obuwie.

3.2.2 Ocena liczby komórek

Określono liczbę komórek jądrowych, komórek zawierających antygen CD34 oraz prekursorów układu granulocytarno-monocytowego w badanym materiale

3.2.2.1 Ocena liczby leukocytów

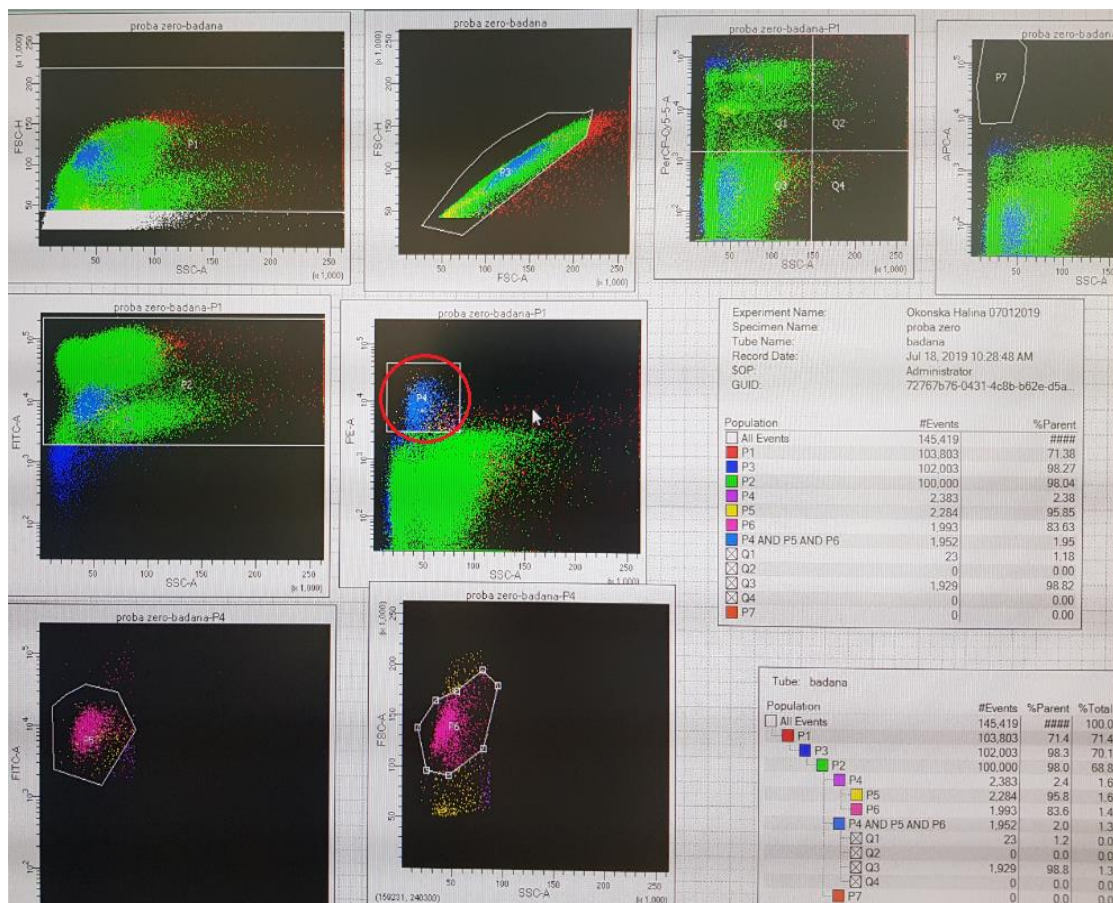
Bezpośrednio po pozyskaniu, oraz w określonych punktach czasowych (po 24h i 48h przechowywania prób w temperaturze 4°C i 20°C) materiał rozcieńczono przy użyciu roztworu PBS (Aqua-Med., Łódź) w stosunku 1:9, następnie materiał poddawano analizie przy użyciu analizatora hematologicznego Micros 60 (ABX, Francja). Do badań wzięto również pod uwagę uzyskany na analizatorze wynik odsetka granulocytów i limfocytów.



Rycina 7. Analizator hematologiczny ABX Micros 60 (zdjęcie własne)

3.2.3 Ocena odsetka komórek CD34+

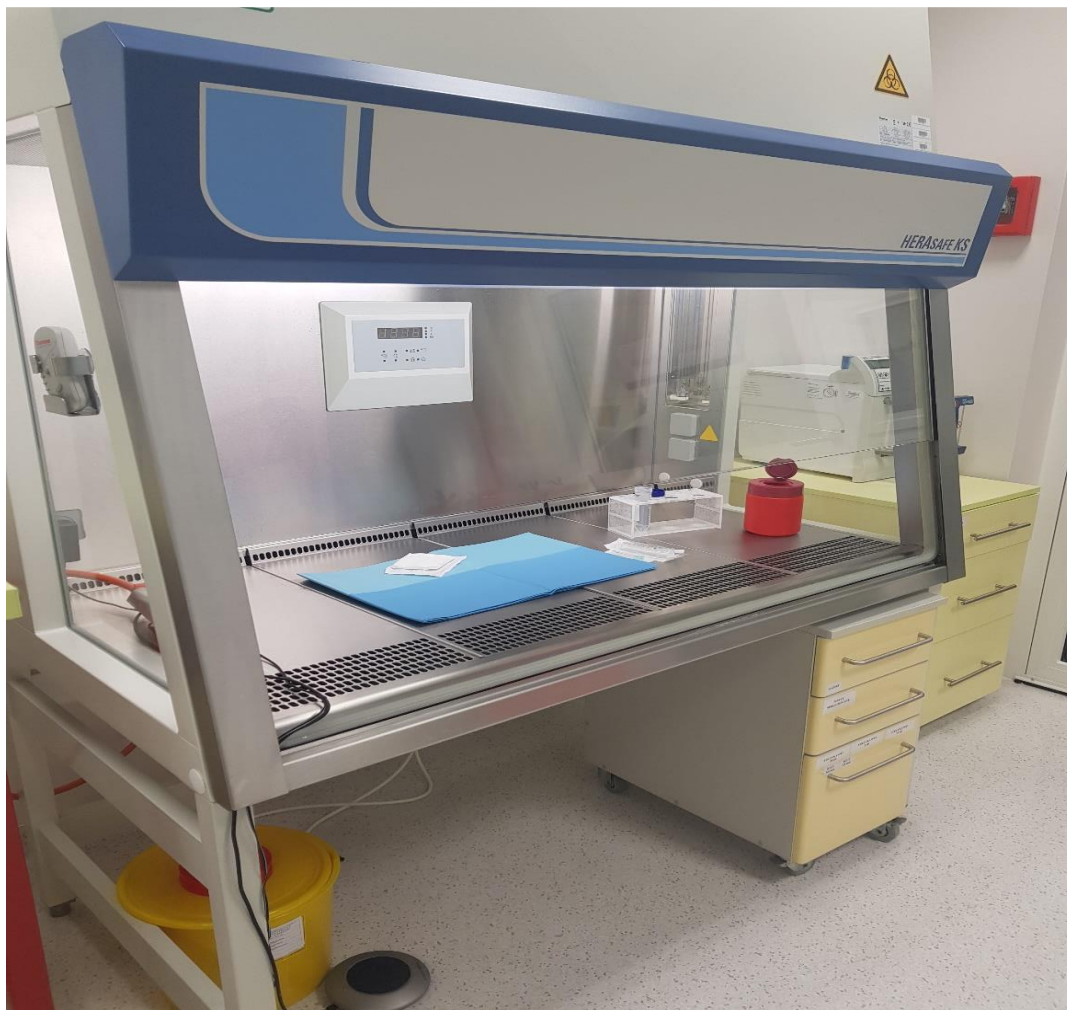
Oceny dokonano z wykorzystaniem cytometru przepływowego (Becton Dickinson FACS Canto oraz Becton Dickinson Kalibur) przy użyciu zestawu Stem-Kit Reagents (Beckman Coulter, USA). Zestaw do oznaczania komórek CD34 jest produktem komercyjnym i standaryzowanym. Postępowano zgodnie z zaleceniem producenta. Do trzech probówek (kontrola, badana 1 i badana 2) rozporcjowano 100 µl badanej próby. Do probówki kontrolnej dodano 20 µl odczynnika CD45 FITC/ Control/7-AAD, natomiast do probówek „badana 1” i „badana 2” dodano 20 µl odczynnika CD45 FITC/CD34 PE/7-AAD. Próbkę 5 sekund mieszało się z użyciem wstrząsarki a następnie inkubowało w temperaturze pokojowej przez 20 minut bez dostępu światła. Następnie do każdej probówki dodawano 2 ml roztworu lizującego, ponownie mieszało się przez 5 sekund i inkubowało w temperaturze pokojowej przez 10 minut bez dostępu światła. Podczas przygotowywania prób do analizy zwracano uwagę, by w próbkach nie były obecne pęcherzyki powietrza, które mogłyby zafałszować wynik końcowy. Po tym czasie próby analizowano na cytometrze przepływowym. Analizie poddano 75 000 zdarzeń. Próby przechowywane w ciemności w łaźni lodowej nadają się do oceny przez godzinę. Końcowy wynik podawano jako odsetek komórek CD34+ w obrębie komórek CD45+. Podczas analizy prób przestrzegano serii 8 histogramów i schematu bramkowania. Pierwsze 4 histogramy ustawiano zgodnie z wytycznymi ISHAGE dotyczącymi oznaczania komórek CD34+ metodą cytometrii przepływowej, natomiast histogramy 5-7 były przeznaczone do monitorowania parametrów mających znaczenie na etapie akwizycji. Histogram 8 służył do rozróżnienia komórek żywych i martwych. W pierwszym etapie bramkowano wszystkie leukocyty CD45+ i eliminowano płytki krwi, resztki krwinek czerwonych i agregaty. Następnie selekcjonowano wszystkie zdarzenia CD34+. Wynik podawano jako wartość odsetkową komórek CD34+ w obrębie komórek CD45+. Analizę liczby komórek CD34+ przeprowadzono w systemie dwuplatformowym.



Rycina 8. Przykładowy obraz cytometryczny (zdjęcie własne)

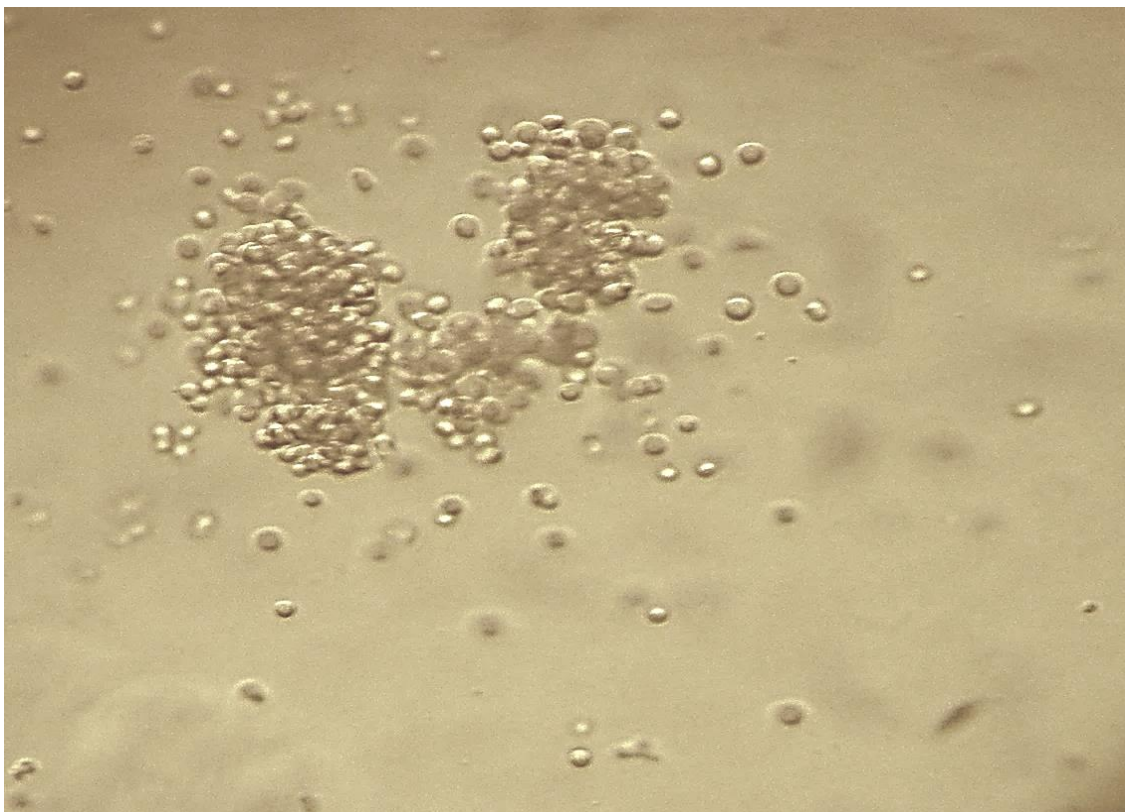
3.2.4 Ocena liczby prekursorów granulocytarno-monocytowych (CFU-GM) za pomocą hodowli komórkowej in vitro

Hodowlę komórek zakładano w warunkach jałowych w komorze z laminarnym pionowym przepływem powietrza Hera safe (Heraeus, USA).



Rycina 9. Komora laminarna z pionowym przepływem jałowego powietrza (zdjęcie własne)

Zawiesinę komórek rozcieńczano przy użyciu RPMI 1640 z L-glutaminą (Sigma-Aldrich, USA) w stosunku 1:4. Z otrzymanej zawiesiny pobierano 2 ml, nawarstwiano na Gradisol L (Aqua-Med, Polska), służący do izolacji, i wirowano 15 minut przy użyciu wirówki Sigma 6K10 (Sigma, Niemcy) z prędkością 400g. Następnie zbierano frakcję leukocytarną wytworzoną na granicy faz. Płukano dwukrotnie RPMI, wirowano 15 minut przy prędkości 300g. Następnie 100 μ l zawiesiny zawierającej 10^5 komórek dodawano do 900 μ l podłoża półpłynnego MethoCult H4534 (Stem Cell, Kanada) zawierającego: 1% metylocelulozę w podłożu hodowlanym Iscove, bydlęcą surowicę płodową, albuminę bydlęcą, 2-merkaptotanol, SCF, IL-3, GM-CSF. Materiał rozmieszczano na płytce nunclon surface (Nunc, Dania) i umieszczano w szklanej, wilgotnej płytce Petriego. Inkubację prowadzono w inkubatorze Cellstar (5% CO₂, 37°C, wilgotność 100%) przez 7-10 dni. Kolonie zliczano przy użyciu mikroskopu świetlnego (za kolonię uznawano skupisko składające się z ponad 50 komórek).

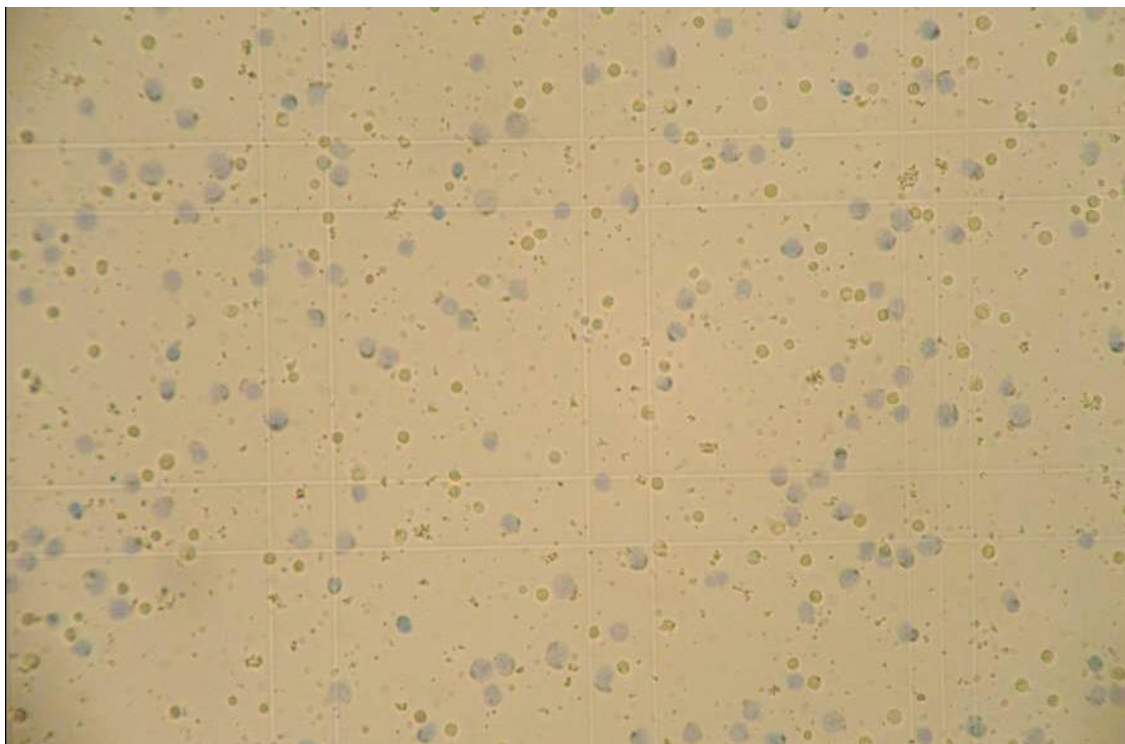


Rycina 10. Kolonie utworzone przez prekursorsy granulocytarno-monocytozowe (CFU-GM) - zdjęcie uzyskane z mikroskopu odwróconego (zdjęcie własne)

3.3 Ocena żywotności komórek

3.3.1 Określanie żywotności komórek jednojądrowych metodą wchłaniania błękitu trypanu

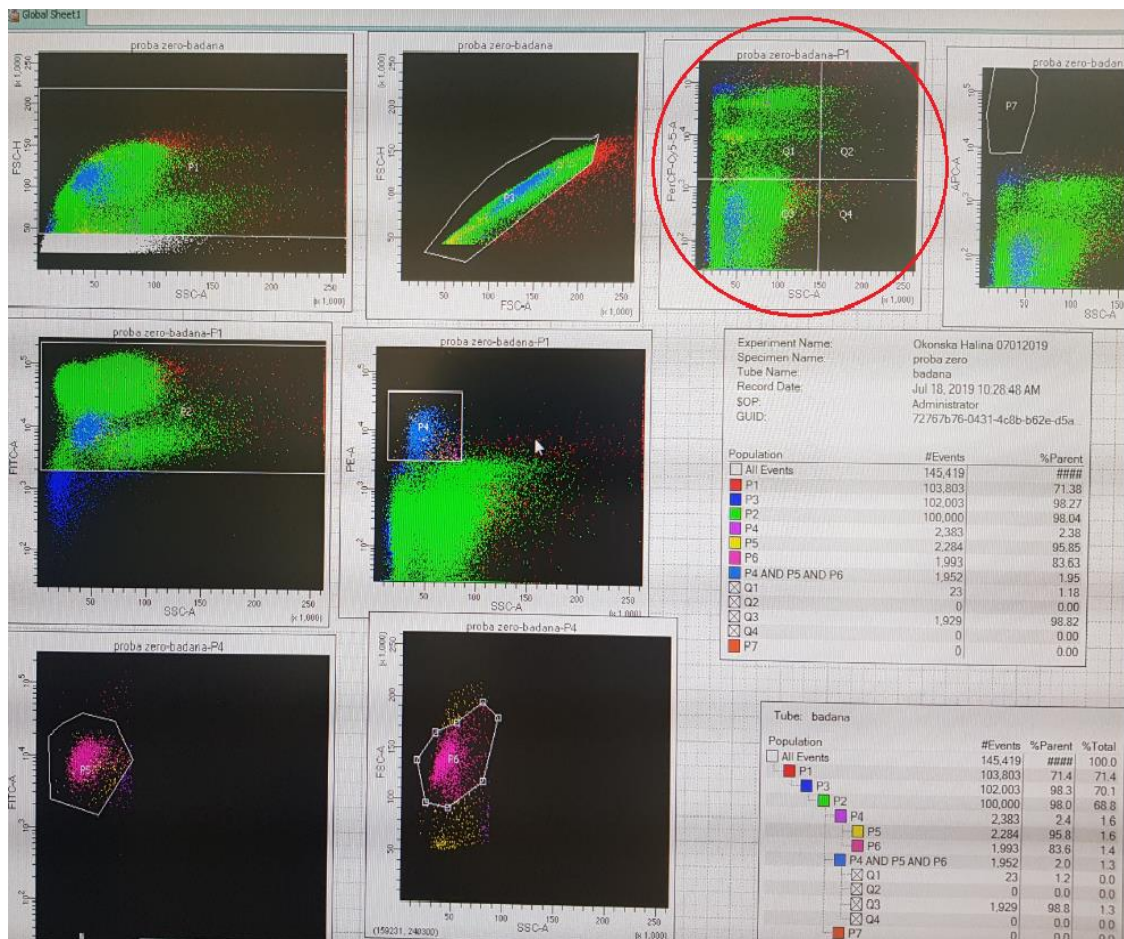
Do 100µl zawiesiny komórek dodawano 100µl 0,4% roztworu błękitu trypanu (Sigma-Aldrich, USA). Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę. Następnie kilka kropel tak przygotowanej zawiesiny umieszczano w komorze Bürkera, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym. W ostatnim etapie przy użyciu mikroskopu świetlnego zliczano łącznie 100 komórek, wśród nich wyodrębniano: komórki żywe (nie chłone barwnika) i martwe (niebiesko-fioletowe). Wynik podawano jako odsetek komórek żywych. Rygorystycznie przestrzegano czasu wykonania badania tzn. niezwłocznie po nałożeniu inkubowanej zawiesiny na kamerę.



Rycina 11. Metoda oceny żywotności komórek z błękitem trypanu (zdjęcie własne)

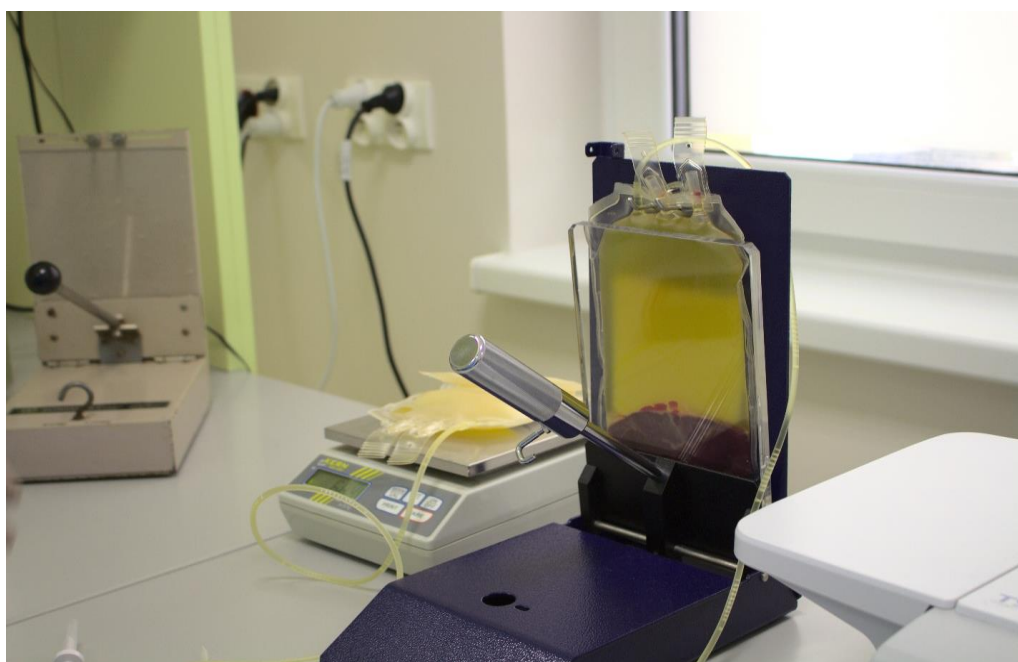
3.3.2 Oznaczanie odsetka żywych komórek CD34+ przy użyciu metody cytometrii przepływowej z 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD)

Do badania żywotności komórek używano zestawu Stem-Kit™ Reagents (Beckman Coulter, USA). Do każdej analizy oznaczano trzy próbki, do których dodano 100 µl zawiesiny komórek. Do próbek 1 i 2 (badana 1 i badana 2) dodano 20 µl odczynnika CD45 FITC/CD34 PE/7-AAD, do próbki 3 (kontrola) dodano 20 µl odczynnika CD45 FITC/Control/7-AAD. Próbkę mieszało przez 5 sekund, następnie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. W dalszej kolejności dodawano po 2 ml roztworu lizującego do każdej próbki, mieszało przez 5 sekund i inkubowano w ciemności przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbki analizowano na cytometrze przepływowym. Analizie poddano 50 000 zdarzeń. Zliczano odsetek komórek CD34+ o niskiej i wysokiej intensywności 7-AAD. Jako wynik podawano odsetek komórek żywych, uzyskanych z różnicy: 100%- odsetek komórek martwych.





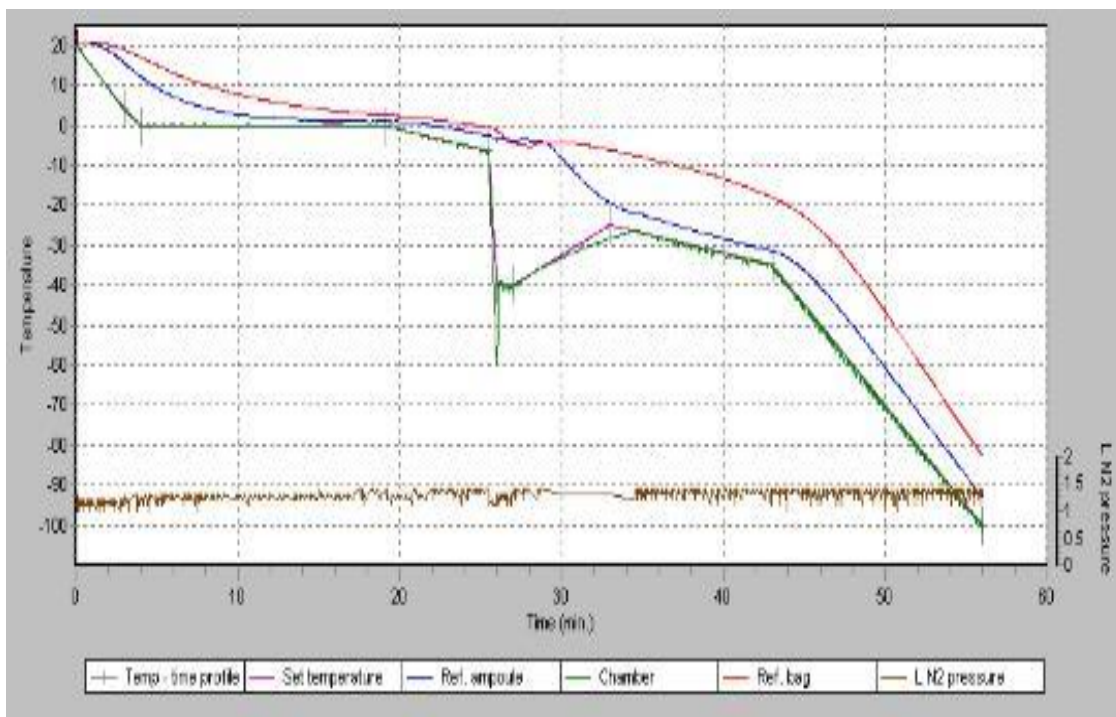
Rycina 13. Wirówka preparatywna Heraeus Cryofuge 5500i (zdjęcie własne)



Rycina 14. Redukcja osocza przy użyciu ręcznego ekstraktora osocza. (zdjęcie własne)

3.5 Krioprezerwacja prób komórek krwiotwórczych

Próby komórek krwiotwórczych o objętości 450 μ l umieszczano w pilotkach (probówkach o pojemności 1,8 ml). Następnie pilotki umieszczano w łaźni lodowej w celu schłodzenia. Bezpośrednio przed zamrożeniem dodawano 450 μ l 20% DMSO (OriGen GmbH) w osoczu autologicznym. Podczas dodawania próbę cały czas mieszano. W ten sposób otrzymywano końcowy roztwór zawierający 10% DMSO. W dalszej kolejności materiał zamrażano metodą programowaną zgodnie z wykresem przedstawionym na rycinie 16. Krzywa koloru niebieskiego na wykresie obrazuje przebieg zmian temperatur, które zachodzą w badanych próbach, zielona w komorze do zamrażania, natomiast krzywa czerwona wskazuje na zmiany temperatur w pojemniku z materiałem transplantacyjnym. Zamrażanie przebiega w ciągu 56 minut, etapami. W pierwszym etapie następuje obniżanie temperatury o 5°C/min. Aż do osiągnięcia temperatury 0°C. W drugim etapie następuje szybkie schładzanie, obniżanie temperatury o 1°C/min. aż do uzyskania temperatury -6,5°C. W tym czasie temperatura w komorze chwilowo osiąga wartość około -55°C. W kolejnym etapie następuje obniżanie temperatury o 40°C/min, aż do osiągnięcia temperatury -40°C. Następnie dochodzi do wzrostu temperatury o 5°C/min, wtedy temperatura w komorze wynosi -25°C. Następnie szybkość chłodzenia wynosi 1°C/min. i temperatura w komorze osiąga wartość -35°C. W ostatnim etapie obniżanie temperatury następuje z szybkością 5°C/min. a temperatura w komorze wynosi -100°C. Po tym czasie pilotki wraz z materiałem transplantacyjnym są umieszczane w zbiorniku magazynowym zasilanym w ciekły azot.



Rycina 15. Krzywa zamrażania- metoda kontrolowana (zdjęcie własne)

3.6 Przechowywanie prób komórek krwiotwórczych

Pilotki zawierające zawiesinę komórek po przeprowadzonym procesie krioprezerwacji umieszczano w zbiornikach magazynowych w parach ciekłego azotu, w temperaturze -156°C do czasu ich rozmrożenia. Lokalizację poszczególnych prób w zbiorniku odnotowywano każdorazowo w programie komputerowym. Takie katalogowanie ułatwiało w przyszłości odnalezienie prób przeznaczonych do badań.



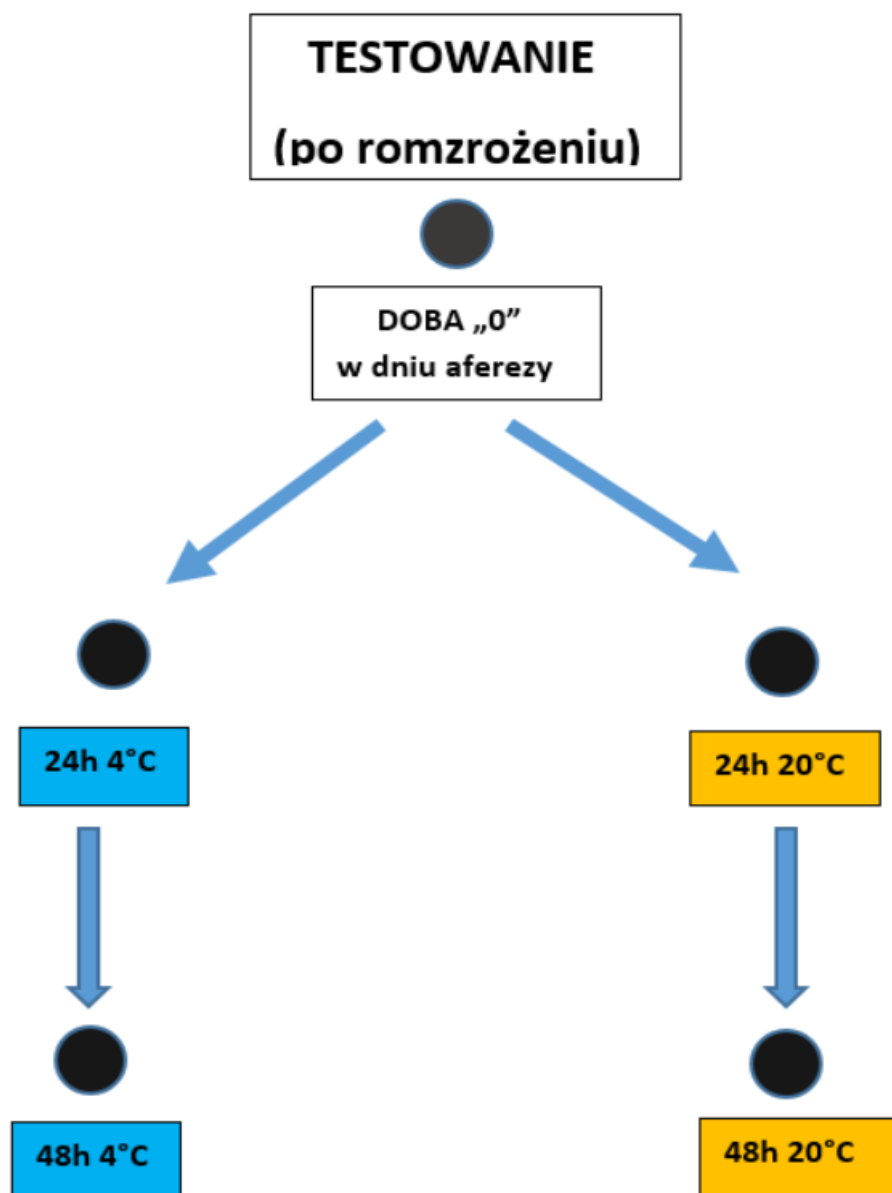
Rycina 16. Zbiorniki magazynowe zasilane w ciekły azot (zdjęcie własne)

3.7 Rozmrażanie prób komórek krwiotwórczych

Po określeniu lokalizacji próby, pilotkę z komórkami wyjmowano ze zbiornika magazynowego i niezwłocznie umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C do czasu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Po uzyskaniu jednorodnej zawiesiny bez grudek lodu próbkę rozcieńczano przy użyciu RPMI 1640 z L-glutaminą (Sigma-Aldrich, USA) w stosunku 1:4.

3.8 Testowanie rozmrożonych komórek krwiotwórczych

Testowanie rozmrożonych prób KK odbywało się analogicznie do testowania świeżego materiału, metodami przedstawionymi powyżej. Testowanie obejmowało: ocenę liczby komórek jednojądrowych, komórek CD34+, żywotność komórek jednojądrowych oraz komórek CD34+ a także ocenę potencjału klonogenego metodą hodowli in vitro. Badania przeprowadzono zgodnie z uproszczonym schematem przedstawionym na rycinie 18. Schemat wskazuje, że badania ilościowo-jakościowe wykonywano z wykorzystaniem materiału rozmrożonego, wcześniej przechowywanego w różnych wariantach czasu i temperatury.



Rycina 17. Uproszczony schemat badania

3.9 Analiza statystyczna

Do przeprowadzenia analizy statystycznej zastosowano programy Statistica (StatSoft, Polska) oraz PQStat Software (Polska). Dla każdego ocenianego parametru obliczono medianę, średnią, odchylenie standardowe, maksimum i minimum. Ze względu na brak rozkładu normalnego w ocenie statystycznej zastosowano testy Manna-Whitney'a, Anova Friedmana oraz test POST-HOC Dunn Bonferroni. We wszystkich zastosowanych testach za poziom istotności uznano $p < 0,05$. Analizę statystyczną

przeprowadzono przy współpracy z Katedrą Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4. Wyniki

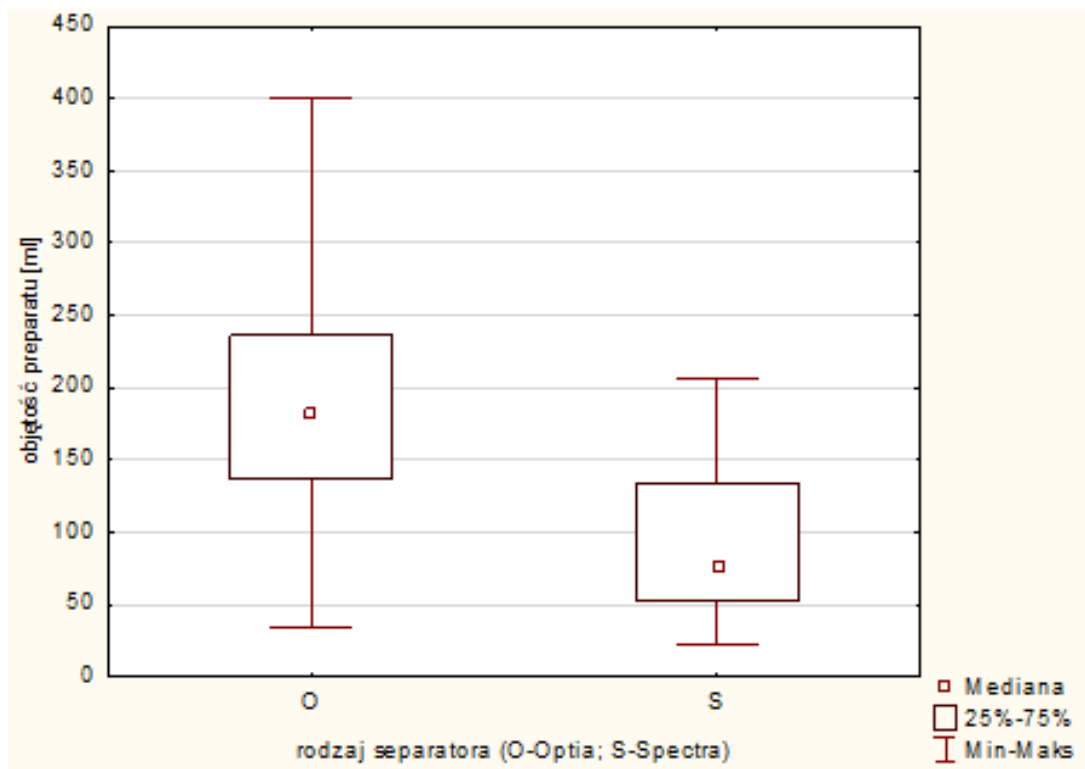
4.1 Analiza prób pod względem zastosowanego do leukaferozy separatora komórkowego

4.1.1 Porównanie objętości uzyskanego preparatu w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

Przy użyciu wagi laboratoryjnej oceniono objętość preparatów pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra). W tabeli 4 i na wykresie 1 porównano objętość preparatów uzyskaną przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Preparaty komórek krwiotwórczych uzyskane za pomocą separatora Spectra Optia charakteryzowały się istotnie statystycznie większą objętością, niż te uzyskane przy użyciu separatora Cobe Spectra ($p < 0,05$). Na wykresie 1 zaobserwowano również dużo większą maksymalną objętość uzyskaną na separatorze Spectra Optia.

	Objętość preparatu [ml]				
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	182	193 $\pm$ 80	34	400	0,000000
Spectra	76	92 $\pm$ 50	22	206	

Tabela 5. Porównanie objętości preparatów pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



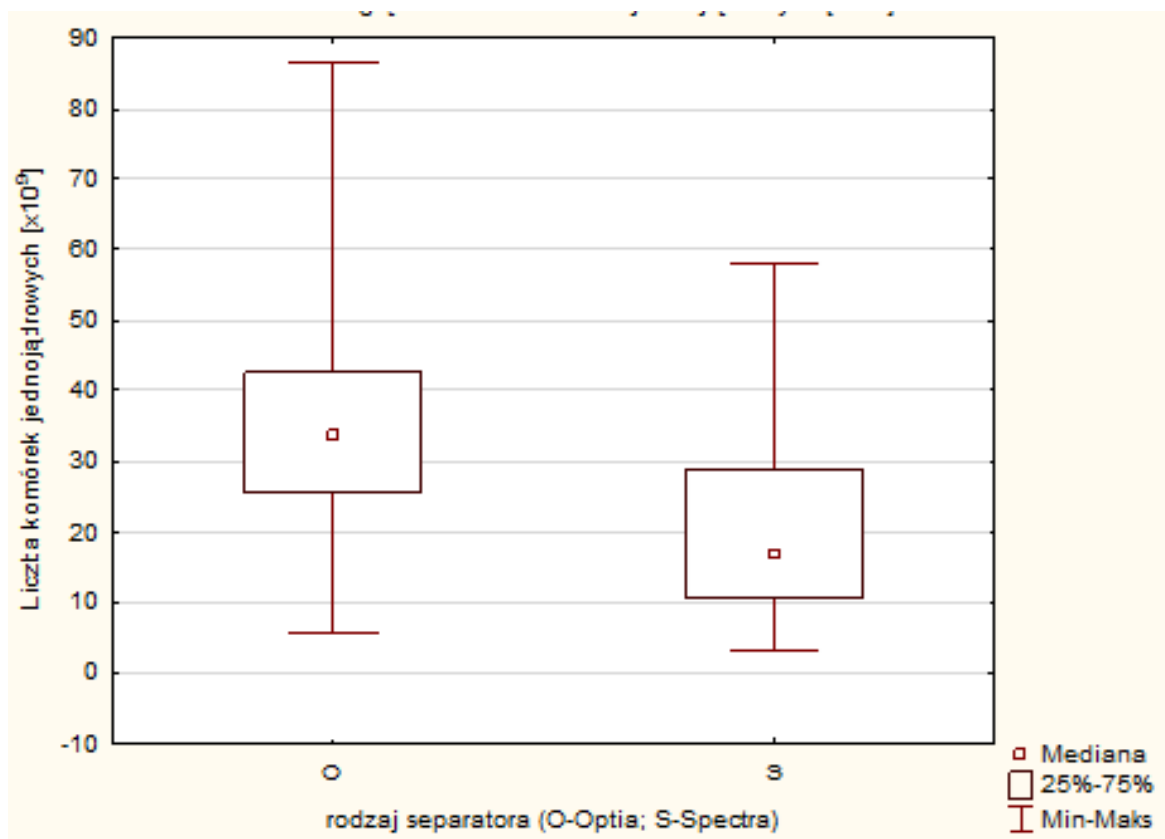
Wykres 1. Porównanie objętości preparatów pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

4.1.2 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych (MNC) w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

W tabeli 5 i na wykresie 2 porównano bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych uzyskaną przy zastosowaniu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Na podstawie analizy bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych przy użyciu analizatora hematologicznego stwierdzono istotnie statystycznie wyższą liczbę komórek w przypadku użycia separatora Spectra Optia niż Cobe Spectra ($p < 0,05$).

	Bezwzględna liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$]				
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	33,52	193 $\pm$ 80	5,68	86,49	0,000000
Spectra	16,98	92 $\pm$ 50	3,22	58,02	

Tabela 6 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



Wykres 2. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

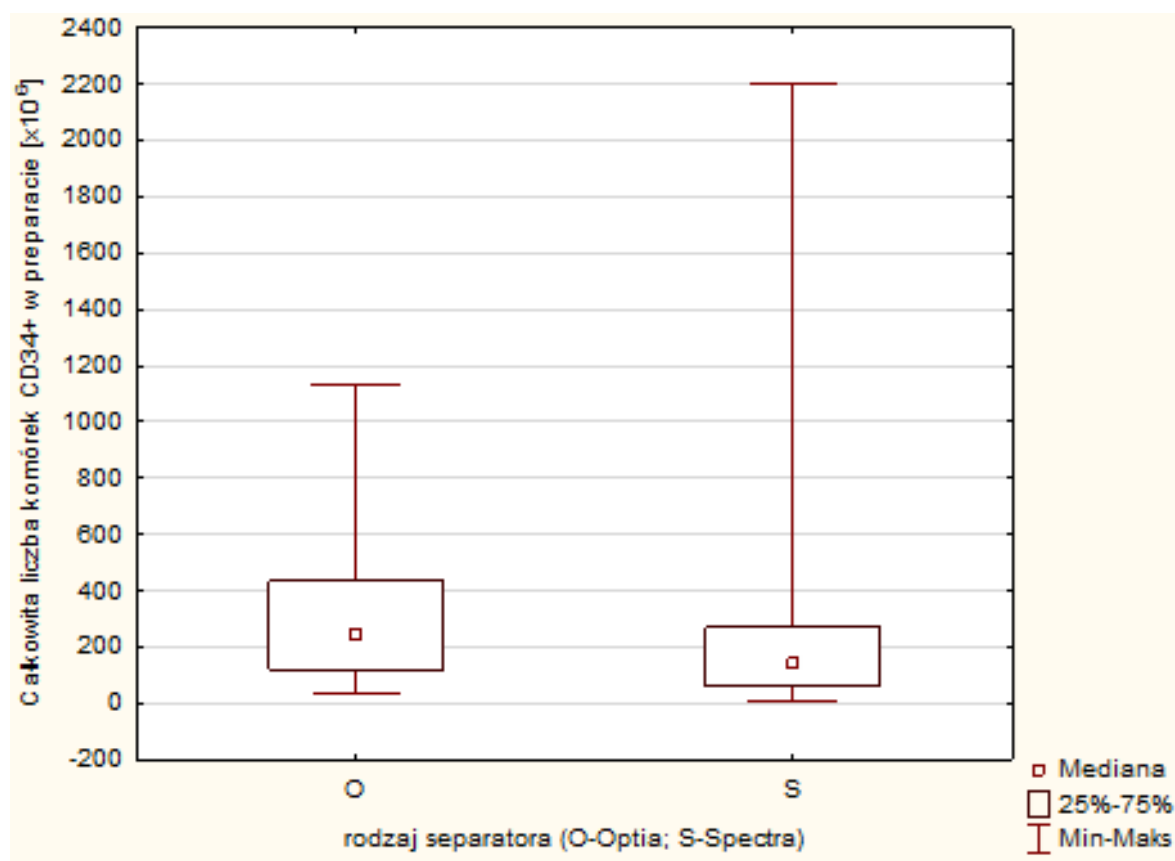
4.1.3 Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

W tabeli 6 i na wykresie 3 porównano całkowitą liczbę komórek CD34+ pozyskaną przy użyciu separatorów Cobe Spectra (S) i Spectra Optia (O). Całkowita liczba komórek CD34+ oceniona metodą cytometrii przepływowej była istotnie statystycznie wyższa w przypadku użycia separatora Spectra Optia niż Cobe Spectra

($p < 0,05$). Na wykresie 3 widoczne jest również, iż znacznie wyższą wartość maksymalną całkowitej liczby komórek CD34+ uzyskano na separatorze Cobe Spectra.

Rodzaj separatora	Całkowita liczba komórek CD34+ przed zamrożeniem [10^6]				
	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	243,82	296,03 $\pm$ 223,20	30,9	1129,14	0,000003
Spectra	143,32	203,15 $\pm$ 234,06	7,05	2204,57	

Tabela 7. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



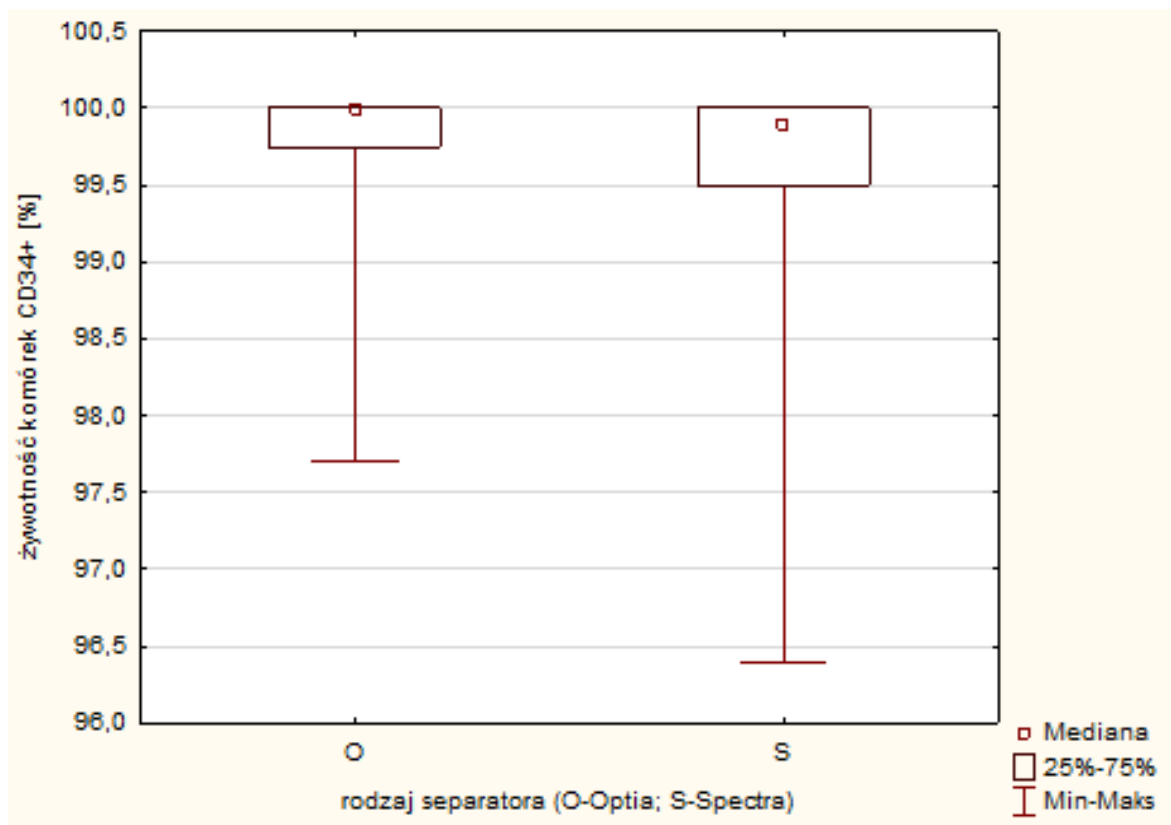
Wykres 3. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

4.1.4 Porównanie żywotności komórek CD34+ metodą cytometrii przepływowej z użyciem 7-AAD przed zamrożeniem w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

W tabeli 7 i na wykresie 4 dokonano porównania żywotności komórek CD34+ przed zamrożeniem w materiale pozyskanym przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Żywotność komórek CD34+ oceniona metodą cytometrii przepływowej w przypadku obu separatorów była na wysokim poziomie, wartości minimalne wynosiły 97,7%- Spectra Optia oraz 96,4%- Cobe Spectra, istotnie statystycznie wyższą wartość stwierdzono w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia ($p < 0,05$).

	Żywotność komórek CD34+ przed zamrożeniem [%]				
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	100	99,81 $\pm$ 0,39	97,7	100	0,017832
Spectra	99,9	99,63 $\pm$ 0,65	96,4	100	

Tabela 8. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych przed zamrożeniem pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



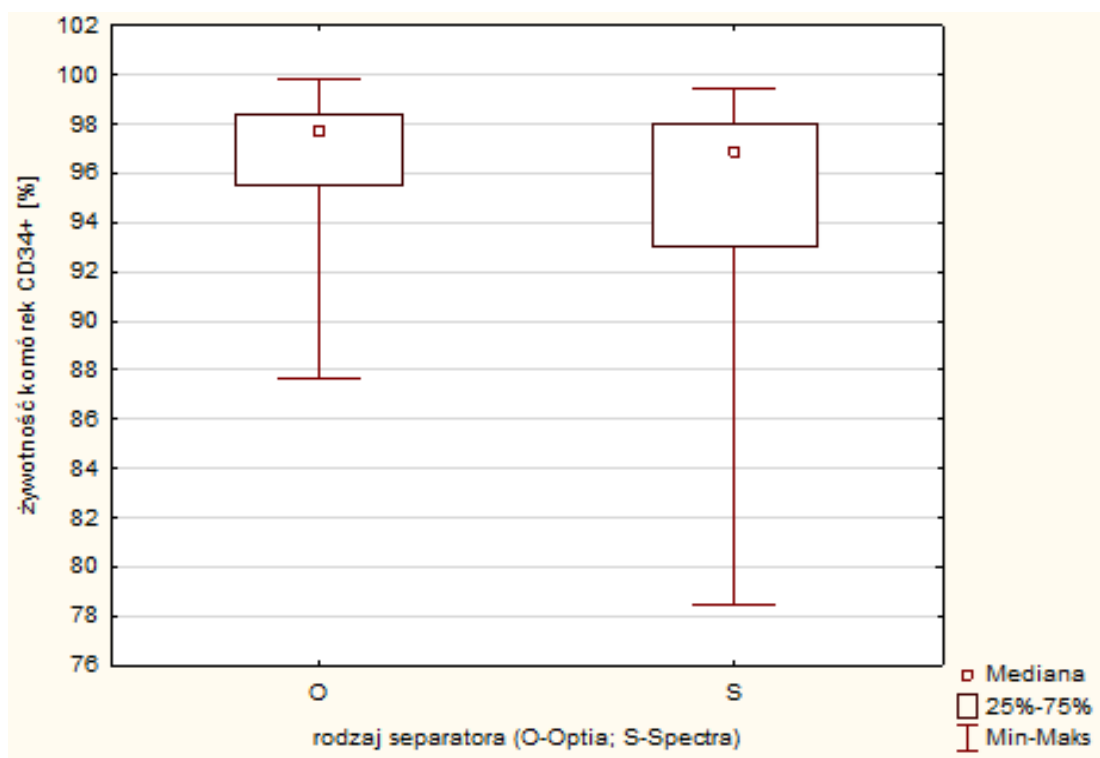
Wykres 4. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych przed zamrożeniem pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

4.1.5 Porównanie żywotności komórek CD34+ po rozmrożeniu oceniana metodą cytometrii przepływowej w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

W tabeli 8 i na wykresie 5 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale pozyskanym przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Żywotność komórek CD34+ oceniona po rozmrożeniu metodą cytometrii przepływowej była istotnie statystycznie wyższa w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia ($p < 0,05$). Jednakże zastosowanie obu separatorów pozwoliło uzyskać preparaty o wysokiej żywotności komórek CD34+ oscylującej wokół 97%, co świadczy o wysokiej jakości materiału transplantacyjnego.

	Żywotność komórek CD34+ po rozmrożeniu [%]				
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	97,79	96,6± 2,8	87,7	99,8	0,033355
Spectra	96,9	94,65± 4,94	78,5	99,4	

Tabela 9. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



Wykres 5. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

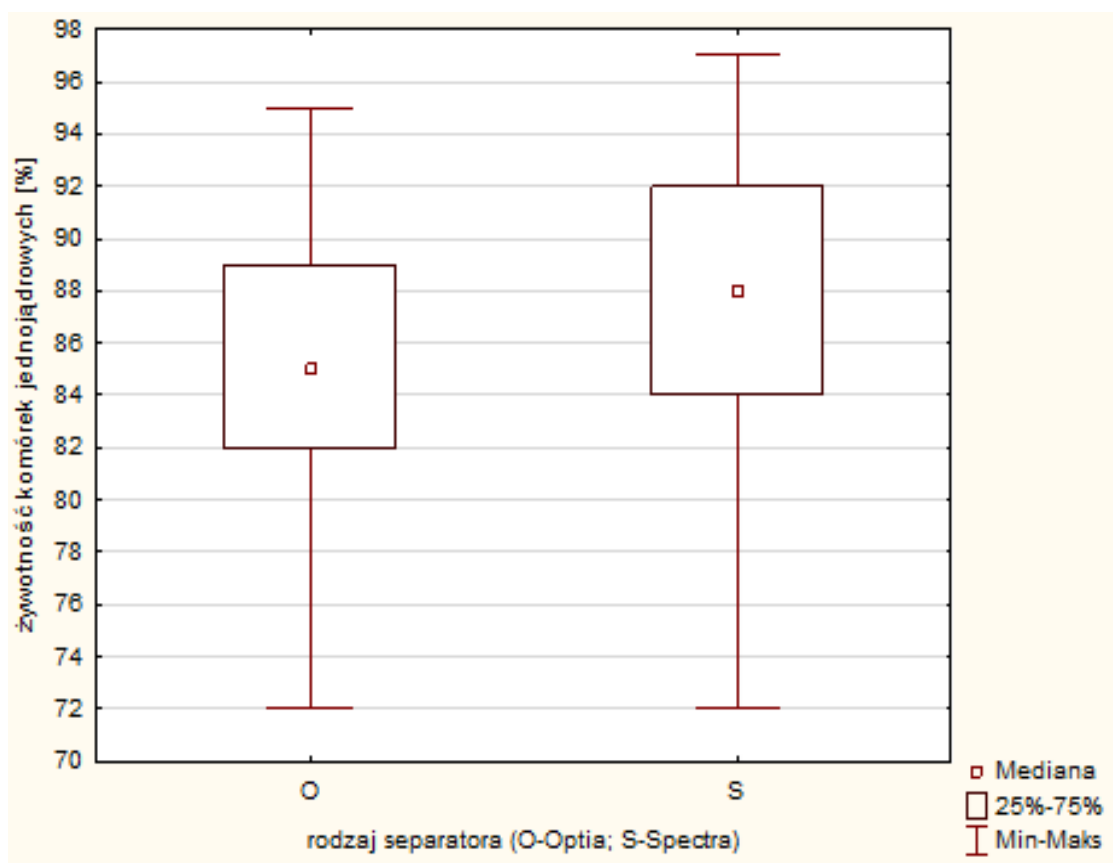
4.1.6 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych po rozmrożeniu oceniana w teście z błękitem trypanu w zależności od użytego separatora komórkowego O (Spectra Optia) S (Cobe Spectra)

W tabeli 9 i na wykresie 6 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenionych po rozmrożeniu w materiale pozyskanym przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Żywotność komórek jednojądrowych oceniona metodą mikroskopową z zastosowaniem błękitu trypanu była istotnie statystycznie wyższa w przypadku zastosowania separatora Cobe Spectra. Należy

podkreślić, że żywotności uzyskane przy użyciu separatora Spectra Optia były również wysokie.

Żywotność komórek jednojądrowych po rozmrożeniu [%]					
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Optia	85	85 $\pm$ 4,92	72	95	0,025389
Spectra	88	87 $\pm$ 5,84	72	97	

Tabela 10. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych



Wykres 6. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych

4.1.7. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz wieku

W tabeli 10 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od użytego separatora oraz wieku, w którym wykazano istotność statystyczną. W tym modelu składającym się z dwóch zmiennych istotny jest rodzaj użytego separatora, wiek nie został wykazany jako istotny statystycznie. Na podstawie wartości R2 skorygowane możemy wnioskować, iż całkowita liczba komórek CD34+ jest zależna w 3% od rodzaju separatora.

	Całkowita liczba komórek CD34+ [10 ⁶]				
Rodzaj separatora	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Regresja wieloraka p-value
Optia	243,82	296,03± 223,20	30,9	1129,14	0,003323
Spectra	143,32	203,15± 234,06	7,05	2204,57	
	Wiek [lata]				
Optia	40	41,46±14,94	19	69	
Spectra	48	45,77±14,73	19	69	
R2 skorygowane	0,032073				
Rodzaj separatora p-value	0,001015				
Wiek p-value	0,970604				

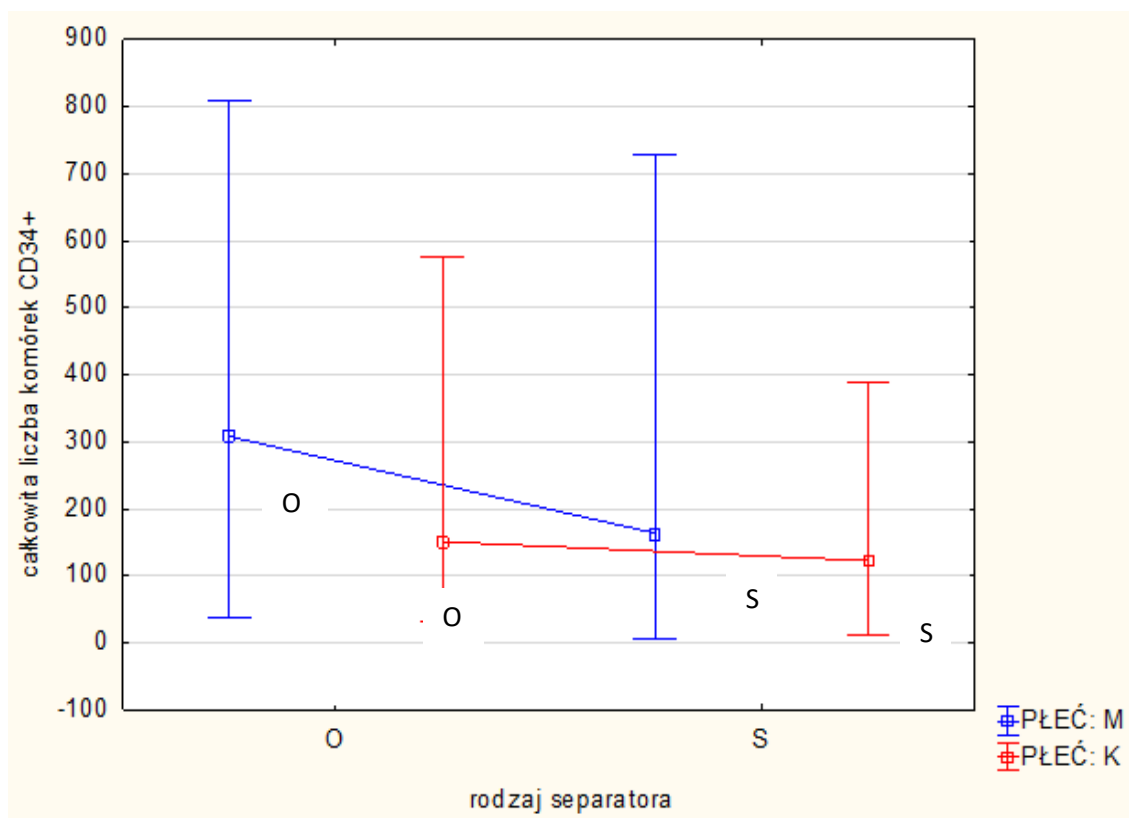
Tabela 11. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz wieku- regresja wieloraka

4.1.8. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz płci

W tabeli 11 oraz na wykresie 7 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od użytego separatora oraz wieku, w którym wykazano istotność statystyczną. Zarówno płeć jak i rodzaj użytego separatora wpływają na liczbę pozyskanych komórek CD34+. Największą medianę całkowitej liczby komórek uzyskano u mężczyzn na separatorze Spectra Optia, natomiast najmniejszą u kobiet na separatorze Cobe Spectra. Jednakże uzyskane wyniki mogą mieć związek z użytą do analizy, mniejszą grupą kobiet poddanych leukaferizie na separatorze Cobe Spectra, aniżeli Spectra Optia.

		Całkowita liczba komórek CD34+ przed zamrożeniem [10 ⁶]				
Rodzaj separatora		Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Regresja wieloraka p-value
Optia		243,82	296,03± 223,20	30,9	1129,14	0,000051
Spectra		143,32	203,15± 234,06	7,05	2204,57	
		Płeć				
Optia	K	150,92	243,74±237,86	30,9	1129,14	
	M	307,74	307,74±207,71	36,43	1056,51	
Spectra	K	122,64	163,26±148,52	11,32	834,92	
	M	163,67	240,3±285,94	7,05	2204,57	
R2 skorygowane		0,059636				
Rodzaj separatora p-value		0,002396				
Płeć p-value		0,003886				

Tabela 12. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz płci-regresja wieloraka



Wykres 7. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanej przy użyciu dwóch różnych separatorów w zależności od płci

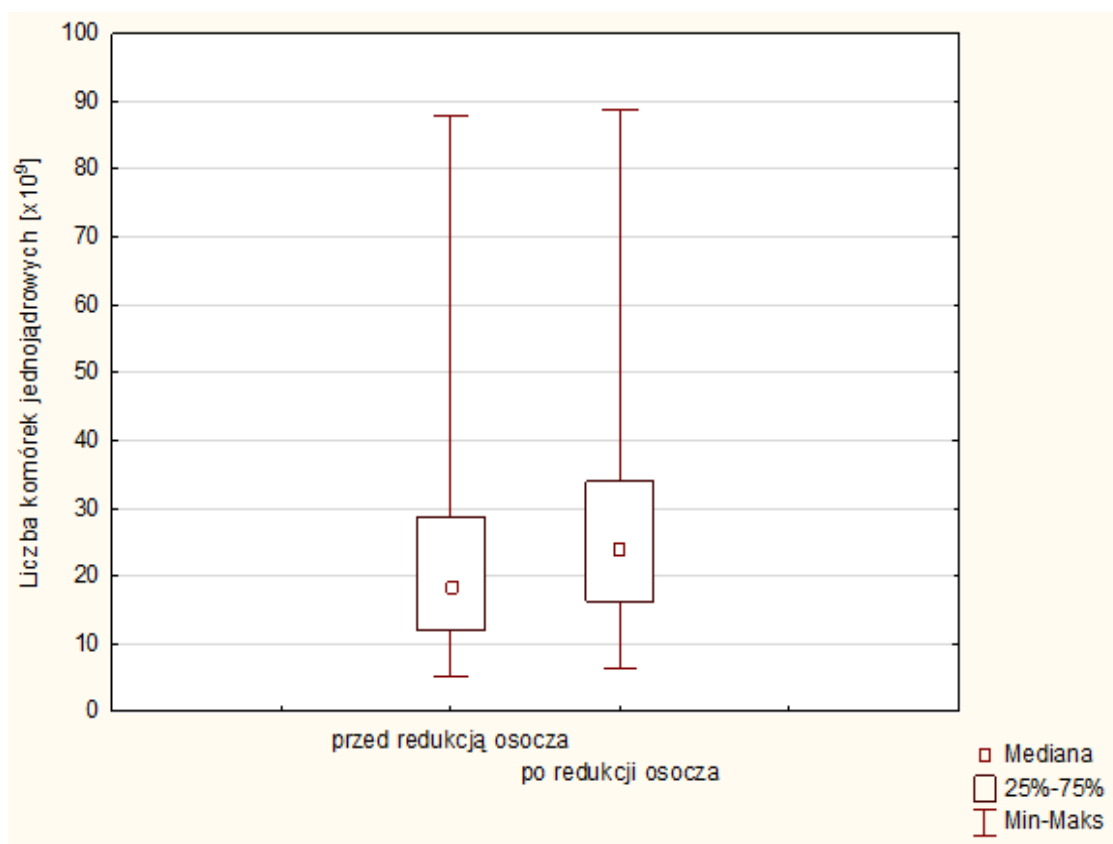
4.2 Preparatyka

4.2.1 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w preparacie przed i po redukcji osocza

W tabeli 10 i na wykresie 8 przedstawiono porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych przed i po redukcji osocza. Mediana bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych ocenianych przy użyciu analizatora hematologicznego w preparacie przed redukcją osocza wynosiła $22,88 \times 10^9$ natomiast po redukcji $23,88 \times 10^9$, wartości te nie różniły się istotnie ($p > 0,05$).

	Bezwzględna liczba komórek jednojądrowych przed i po redukcji osocza [$\times 10^9$]				
Redukcja osocza	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Przed redukcją	22,88	26,4 $\pm$ 13,59	6,85	87,84	0,621891
Po redukcji	23,88	26,43 $\pm$ 13,77	6,50	88,7	

Tabela 13. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w materiale prze i po redukcji osocza



Wykres 8. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w materiale prze i po redukcji osocza

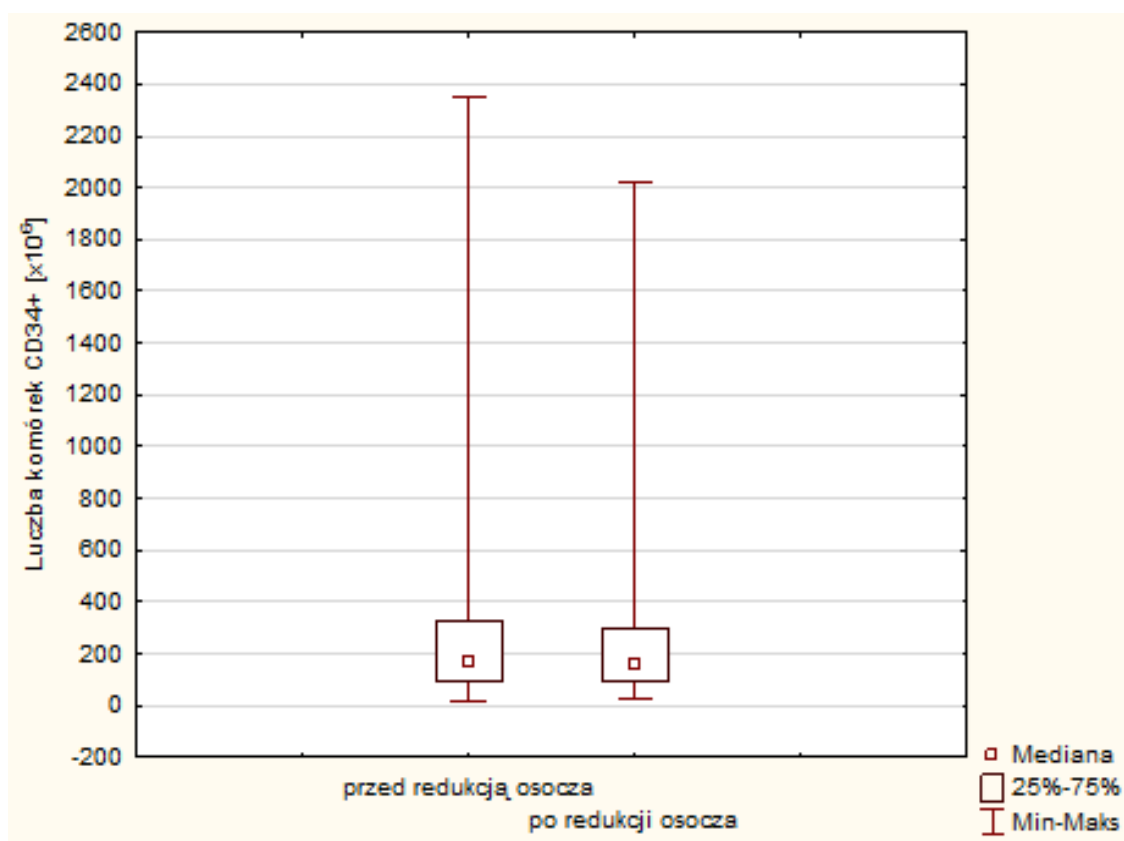
4.2.2 Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w preparacie przed i po redukcji osocza

W tabeli 11 i na wykresie 9 przedstawiono porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ przed i po redukcji osocza. Bezwzględna liczba komórek CD34+ $\times 10^6$ oceniana przy pomocy cytometrii przepływowej po redukcji osocza uległa nieznacznemu

zmniejszeniu, różnica ta nie była istotna statystycznie. Większość wyników skupia się wokół wartości 160×10^6 , natomiast wartość maksymalna wynosi $2204,57 \times 10^6$.

	Bezwzględna liczba komórek CD34+ przed i po redukcji osocza [$\times 10^6$]				
Redukcja osocza	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Przed redukcją	164,06	252,42 $\pm$ 282,14	32,15	2204,57	0,641216
Po redukcji	161,37	251,24 $\pm$ 275,14	31,68	2025	

Tabela 14. Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza



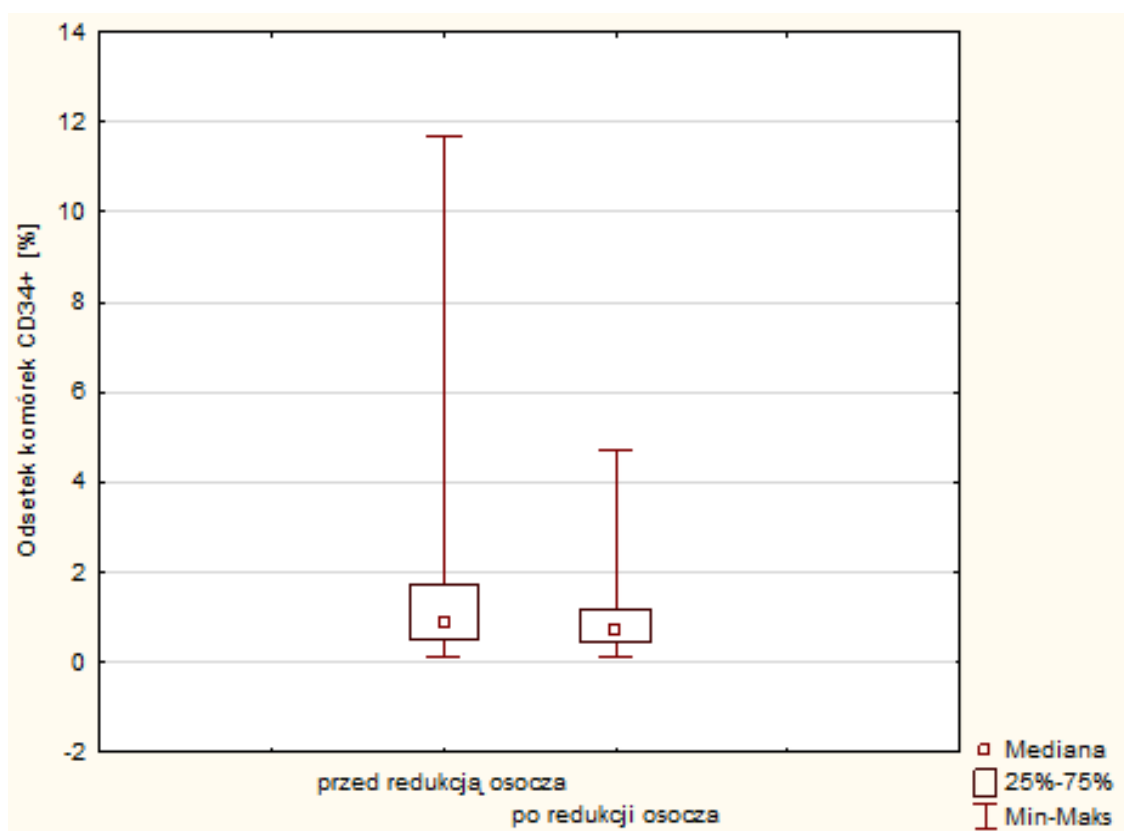
Wykres 9. Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza

4.2.3 Porównanie odsetka komórek CD34+ w preparacie przed i po redukcji osocza

W tabeli 12 i na wykresie 10 przedstawiono odsetek komórek CD34+ przed i po redukcji osocza. Mediana odsetka komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej w preparacie zarówno przed jak i po redukcji osocza była taka sama.

Odsetek komórek CD34+ przed i po redukcji osocza [%]					
Redukcja osocza	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Przed redukcją	0,74	$1 \pm 0,8$	0,15	4,7	0,432883
Po redukcji	0,74	$0,99 \pm 0,81$	0,1	4,7	

Tabela 15. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale przed i po redukcji osocza



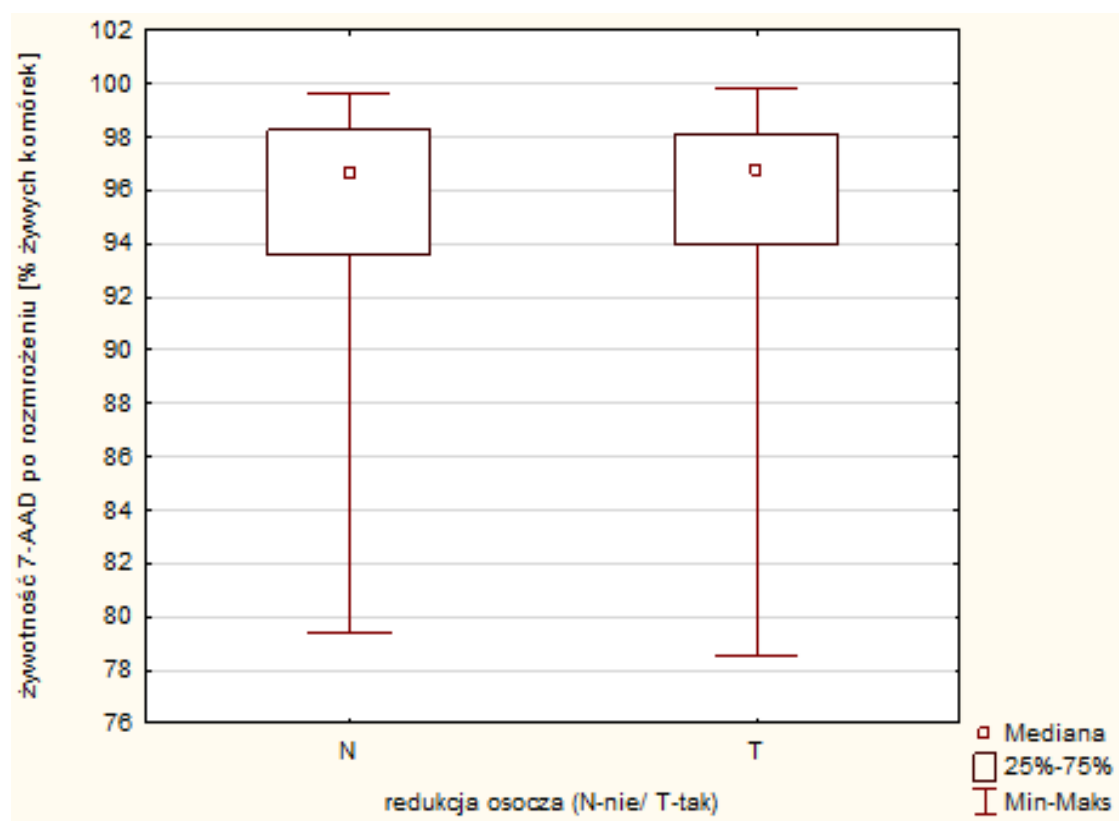
Wykres 10. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale przed i po redukcji osocza

4.2.4 Porównanie żywotności komórek CD34+ w preparacie po rozmrożeniu poddanych i niepoddanych redukcji osocza

W tabeli 13 i na wykresie 11 porównano żywotność komórek CD34+ przed i po redukcji osocza. Mediana żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z użyciem 7-aminoaktynomycyny D po redukcji osocza uległa nieznacznemu zmniejszeniu. Różnice nie były istotne statystycznie.

Żywotność komórek CD34+ przed i po redukcji osocza [%]					
Redukcja osocza	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	Test Manna-Whitneya p-value
Przed redukcją	96,8	95,71± 3,4	78,5	99,8	0,736431
Po redukcji	96,7	95,23± 4,28	79,4	99,6	

Tabela 16. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza



Wykres 11. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza

4.3 Analiza ilościowo-jakościowych parametrów z uwzględnieniem warunków przechowywania materiału komórkowego

4.3.1 Porównanie odsetka komórek CD34+ w świeżym materiale (przed zamrożeniem) w dobie „0” oraz przechowywanym w 4 °C po 24h i 48h

W tabeli 13 i na wykresie 12 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C po 24h i 48h przechowywania. Stwierdzono istotne statystycznie różnice odsetka komórek CD34+ ocenionej przy pomocy cytometrii przepływowej w materiale przechowywanym w 4°C, oceny dokonano przed zamrożeniem. Mediana odsetka była najwyższa w materiale przechowywanym 48h, natomiast najniższa w materiale przechowywanym 24h. W tabeli 15 przedstawiono wielokrotne porównanie odsetka komórek CD34+ (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Stwierdzono istotną statystycznie różnicę odsetka komórek w materiale przechowywanym przez 24h w 4°C i ocenianym w dniu aferezy oraz przechowywanym przez 48h w 4°C i ocenianym w dniu aferezy.

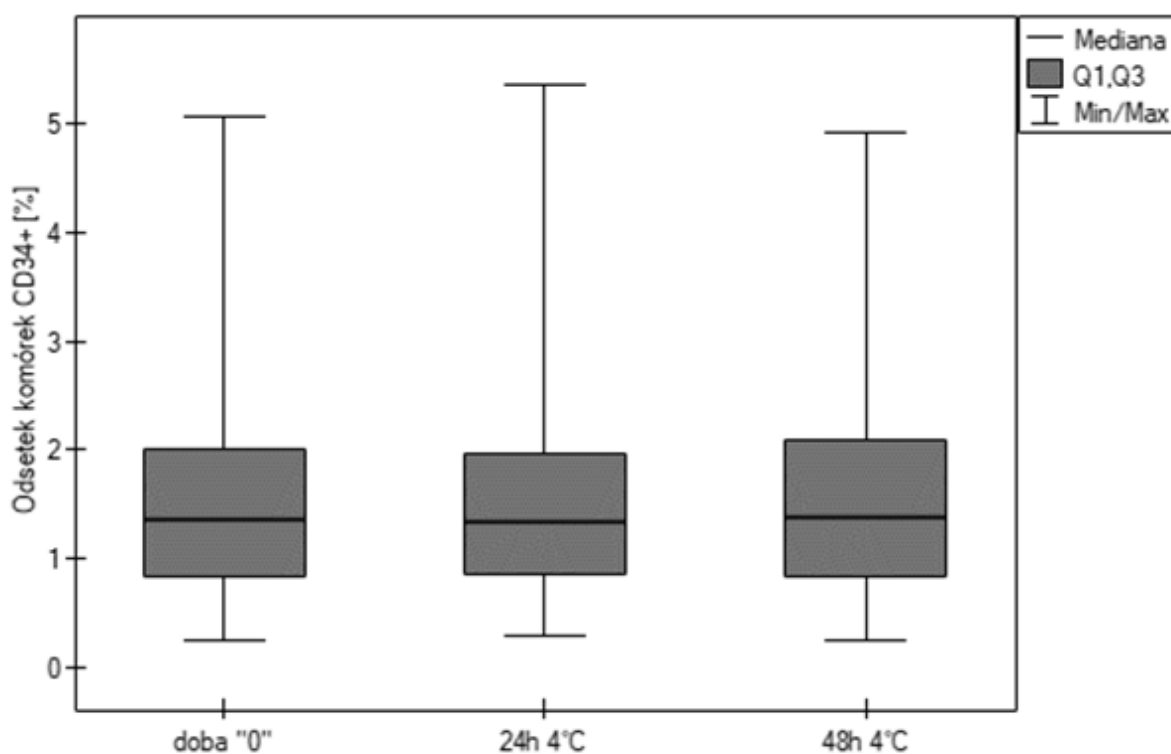
	Odsetek komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C [%]				
Czas przechowywania materiału w temp. 4°C przed zamrożeniem	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	1,36	1,52± 1,04	0,25	5,07	0,003061
24h	1,34	1,62± 1,12	0,3	5,36	
48h	1,39	1,62± 1,09	0,26	4,93	

Tabela 17. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Różnice odsetka komórek CD34+ były istotne statystycznie we wszystkich porównywanych grupach.

Wartość p-value			
Układ badania	CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 4°C	CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 4°C		0,018971	0,015618
CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,018971		1
CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,015618	1	

Tabela 18. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 12. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.2 Porównanie odsetka komórek CD34+ w świeżym materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 16 i na wykresie 13 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem przechowywanym w 20°C po 24h i 48h przechowywania. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartości odsetka komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływową w materiale przechowywanym

w 20°C przed zamrożeniem. Najwyższa mediana wartości odsetka była w materiale świeżym, ocenianym w dniu pobrania- doba „0” , natomiast najniższa w materiale przechowywanym 48h. W tabeli 17 przedstawiono wielokrotne porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale w dniu aferezy oraz przechowywanym przez 24h i 48h w 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni).

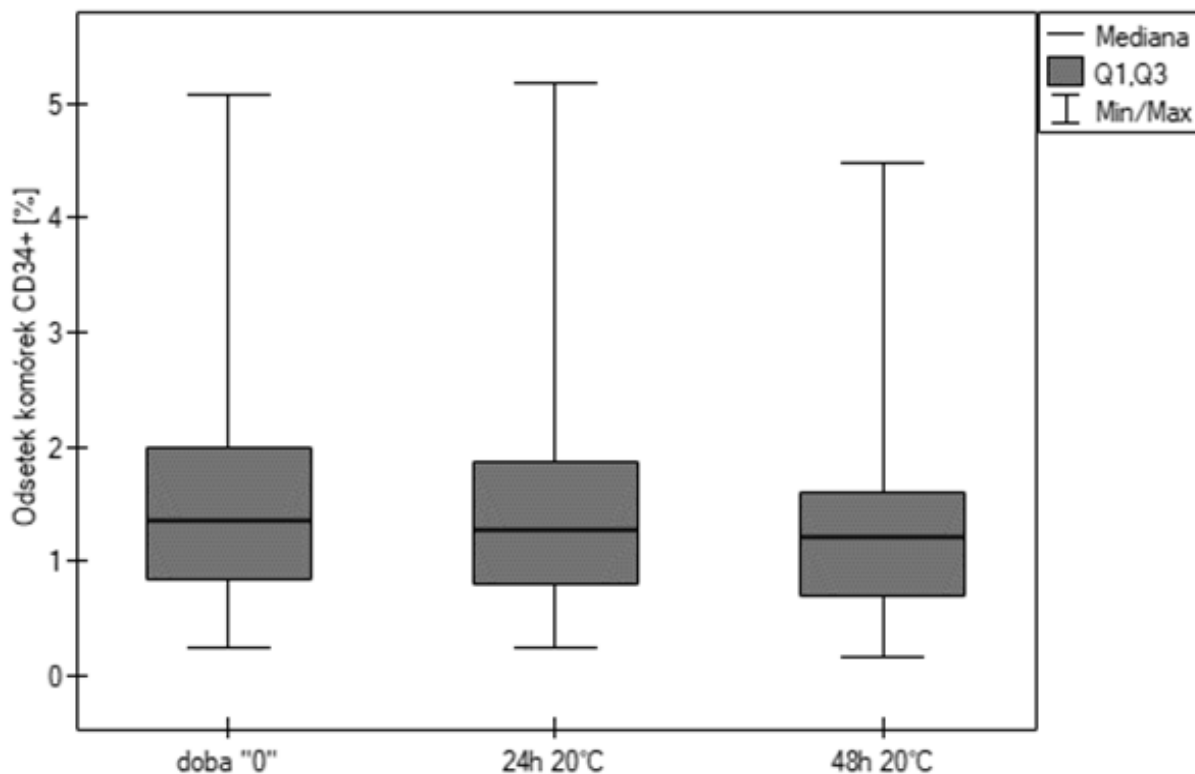
Odsetek komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 20 °C [%]					
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	1,36	1,52± 1,04	0,25	5,07	0,000021
24h	1,28	1,53 ± 1,09	0,25	5,18	
48h	1,2	1,3 ± 0,92	0,16	4,49	

Tabela 19. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w medianie odsetka komórek CD34+ w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym przez 24h. W pozostałych przypadkach porównywane wartości były istotnie różne.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 20°C	CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 20°C		1	0,00019
CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	1		0,000417
CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	0,00019	0,000417	

Tabela 20. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



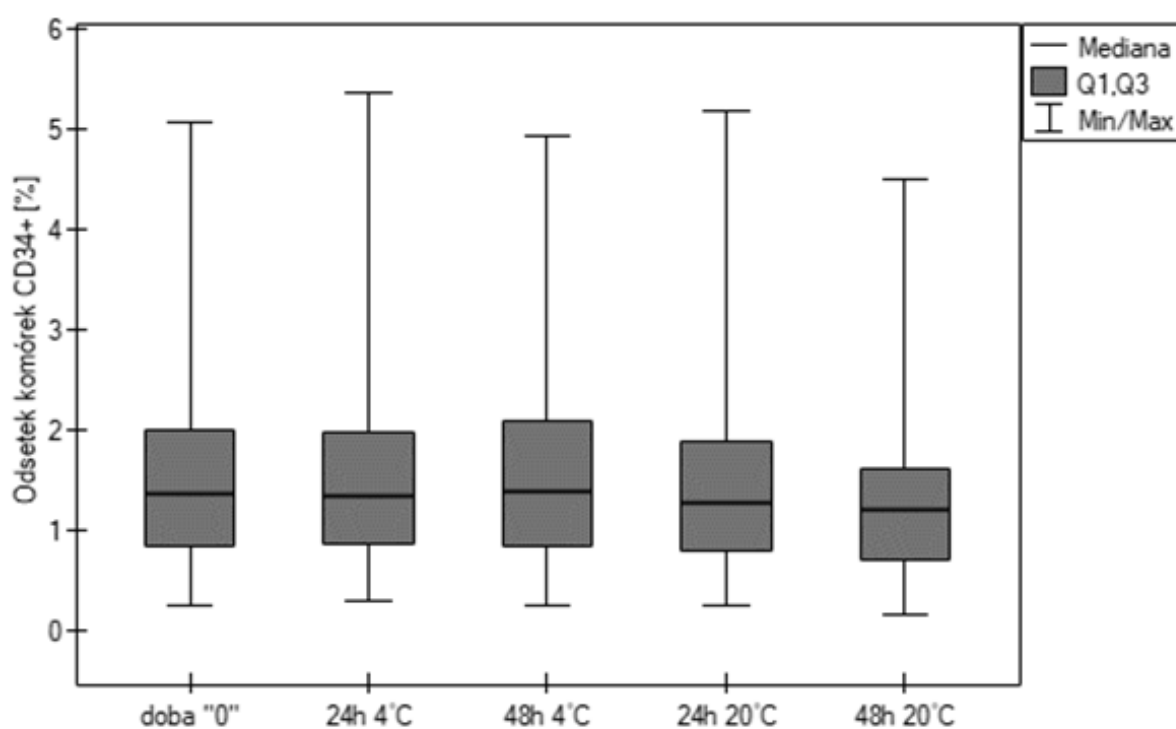
Wykres 13. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

4.3.3 Porównanie odsetka komórek w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h

W tabeli 18 i na wykresie 14 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale w dniu aferezy oraz przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C i 20°C. Mediana odsetka komórek CD34+ była najniższa w materiale przechowywanym przez 48h w 20°C, natomiast najwyższa w materiale przechowywanym przez 48h w 4°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice między medianą odsetka komórek CD34+ w materiałach w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C przez 24h i 48h oraz w 20°C przez 24h i 48h ($p < 0,05$).

	Odsetek komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C i 20 °C [%]				
Przechowywanie w 4 °C i 20 °C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	1,36	1,52± 1,04	0,25	5,07	<0,000001
24h 4°C	1,34	1,62± 1,12	0,3	5,36	
48h 4°C	1,39	1,62± 1,09	0,26	4,93	
24h 20°C	1,28	1,53 ± 1,09	0,25	5,18	
48h 20°C	1,2	1,3 ± 0,92	0,16	4,49	

Tabela 21. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 14. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.4 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 19 i na wykresie 15 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Odsetek komórek CD34+ ocenianym przy użyciu cytometrii przepływowej w materiale przechowywanym w 4°C wzrastał wraz z czasem przechowywania. W tabeli 20 przedstawiono porównanie wielokrotne odsetka w badanych punktach, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (test POST-HOC Dunn Bonferroni).

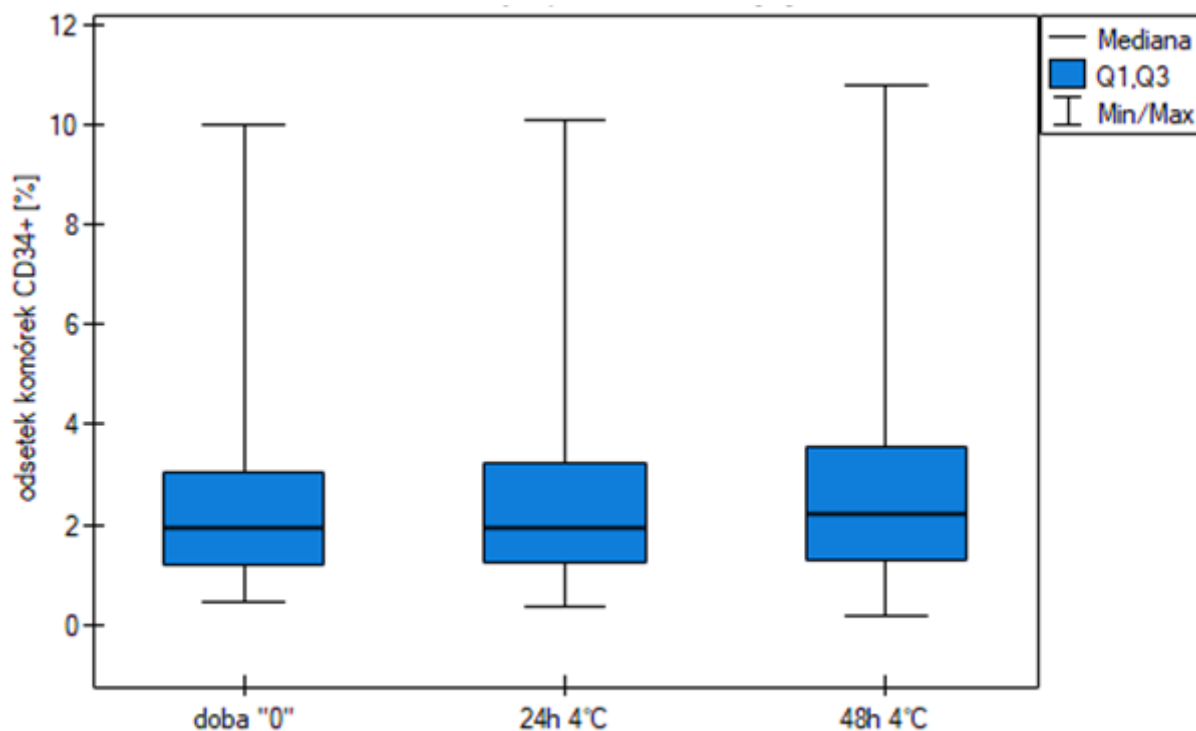
Odsetek komórek CD34+ w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4°C [%]					
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
dobę „0”	1,94	2,41±1,95	0,43	10	0,511891
24h	1,95	2,55±2,07	0,34	10,1	
48h	2,20	2,53±2,12	0,17	10,8	

Tabela 22. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu, przechowywanym w 4°C przez 24h i 48h.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 4°C	CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 4°C		0,998765	1
CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,998765		0,998765
CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	1	0,998765	

Tabela 23. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 15. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.5 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 21 i na wykresie 16 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu po 24h i 48h przechowywanym w 20°C. Mediana odsetka komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej ulega istotnemu statystycznie zmniejszeniu wraz z upływem czasu przechowywania w 20°C. Wartość maksymalna odsetka była znacznie wyższa w dniu aferezy w porównaniu z kolejnymi dniami przechowywania materiału. W tabeli 22 przedstawiono porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+. Istotne statystycznie różnice stwierdzono w materiale ocenianym w dniu aferezy i po 24h przechowywania oraz w dniu aferezy i po 48h przechowywania (test POST-HOC Dunn Bonferroni).

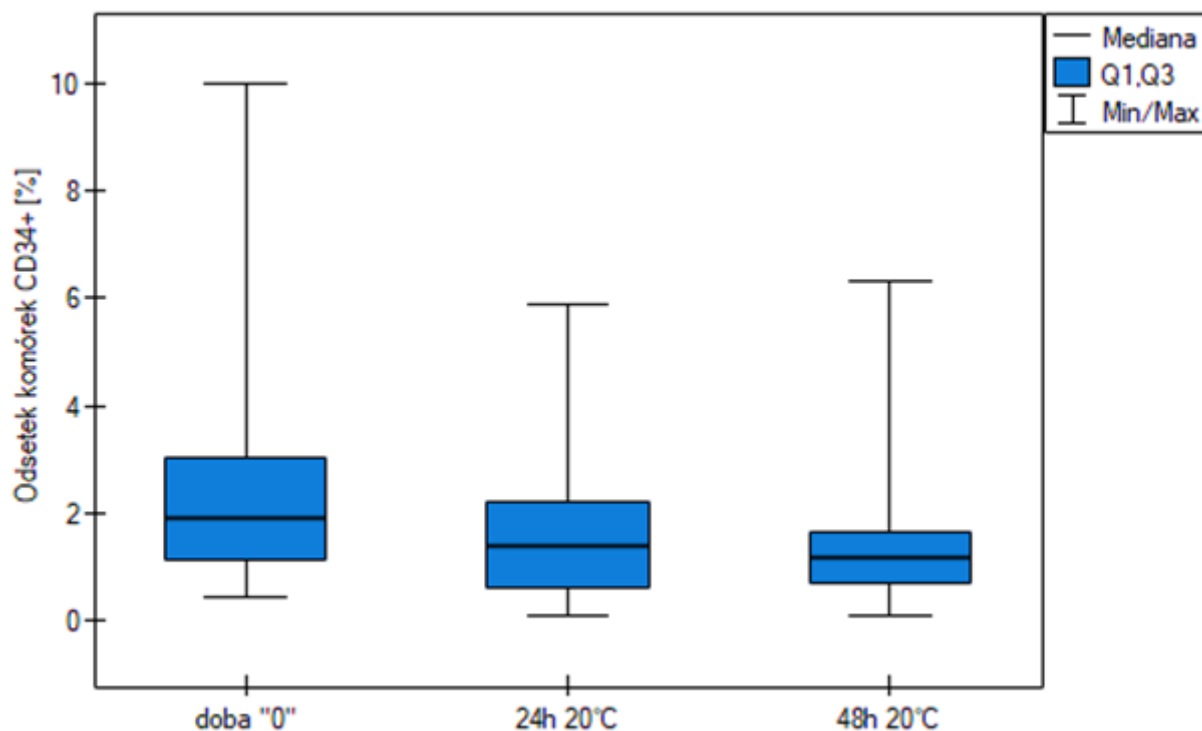
	Odsetek komórek CD34+ w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 20°C [%]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
dobę „0”	1,94	2,41±1,95	0,43	10	0,000001
24h	1,4	1,52 ± 1,78	0,08	5,9	
48h	1,17	1,4 ± 1,19	0,08	6,3	

Tabela 24. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odsetku komórek CD34+ w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 20°C. W porównaniu pozostałych wartości różnice są istotne statystycznie.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 20°C	CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
CD34+ [%] czas przechowywania doba „0” w temp. 20°C		0,000011	<0,000001
CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,000011		0,928887
CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,928887	

Tabela 25. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 16. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

4.3.6 Porównanie odsetka komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h

W tabeli 23 przedstawiono porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w odsetku komórek CD34+ w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C oraz przez 24h i 48h w 20°C. Odsetek komórek CD34+ rośnie wraz z czasem przechowywania materiału w 4°C, natomiast maleje z czasem w materiale przechowywanym w 20°C.

	Odsetek komórek CD34+ w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4 °C i 20 °C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	1,94	2,41±1,95	0,43	10	<0,000001
24h 4°C	1,95	2,55±2,07	0,34	10,1	
48h 4°C	2,20	2,53±2,12	0,17	10,8	
24h 20°C	1,4	1,52 ± 1,78	0,08	5,9	
48h 20°C	1,17	1,4 ± 1,19	0,08	6,3	

Tabela 26. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

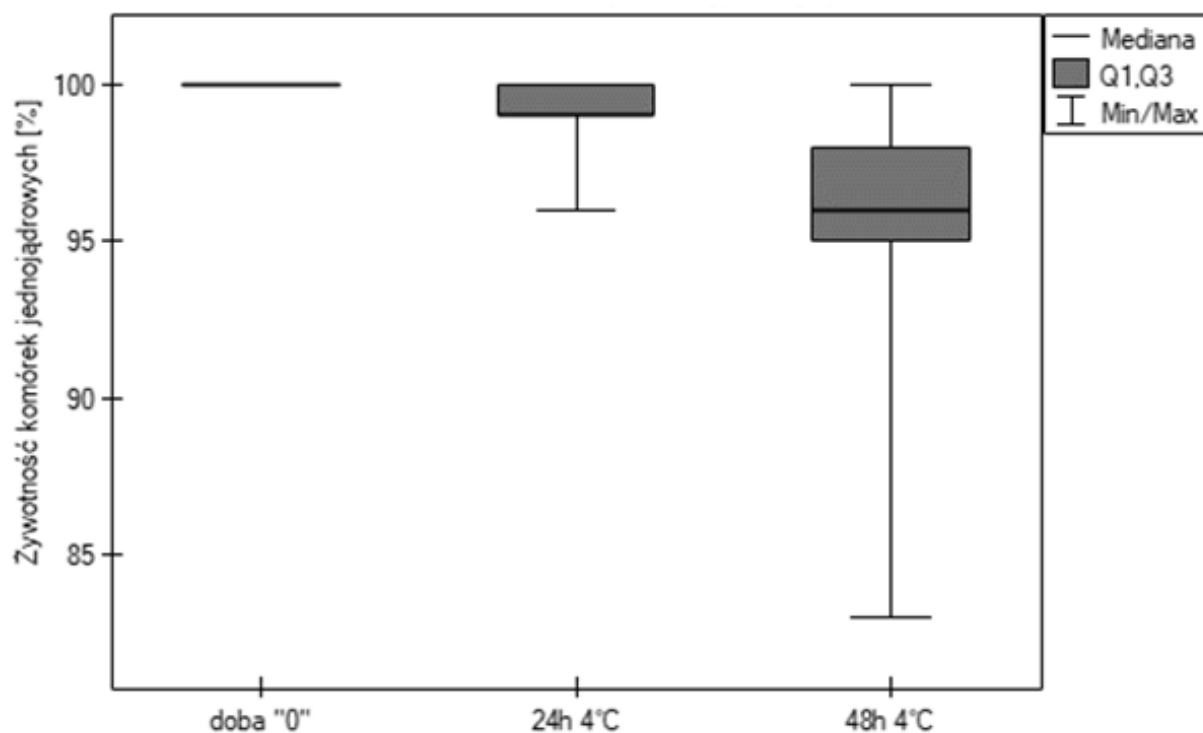
4.3.7 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 24 i na wykresie 17 przedstawiono żywotność komórek jednojądrowych ocenianych w materiale przed zamrożeniem w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Żywotność komórek jednojądrowych ocenianych w teście z błękitem trypanu uległa nieznacznemu zmniejszeniu w materiale przechowywanym w 4°C przez 24h i 48h, różnice były istotne statystycznie. W tabeli 25 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w kolejnych dobach przechowywania materiału w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni).

	Żywotność komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C [%]				
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	100	100	100	100	<0,000001
24h	99	99,13 ± 1,02	96	100	
48h	96	95,97 ± 3,11	83	100	

Tabela 27. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartości żywotności komórek jednojądrowych w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym przez 24h w 4°C.



Wykres 17. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”		0,056396	<0,000001
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,056396		0,000063
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	<0,000001	0,000063	

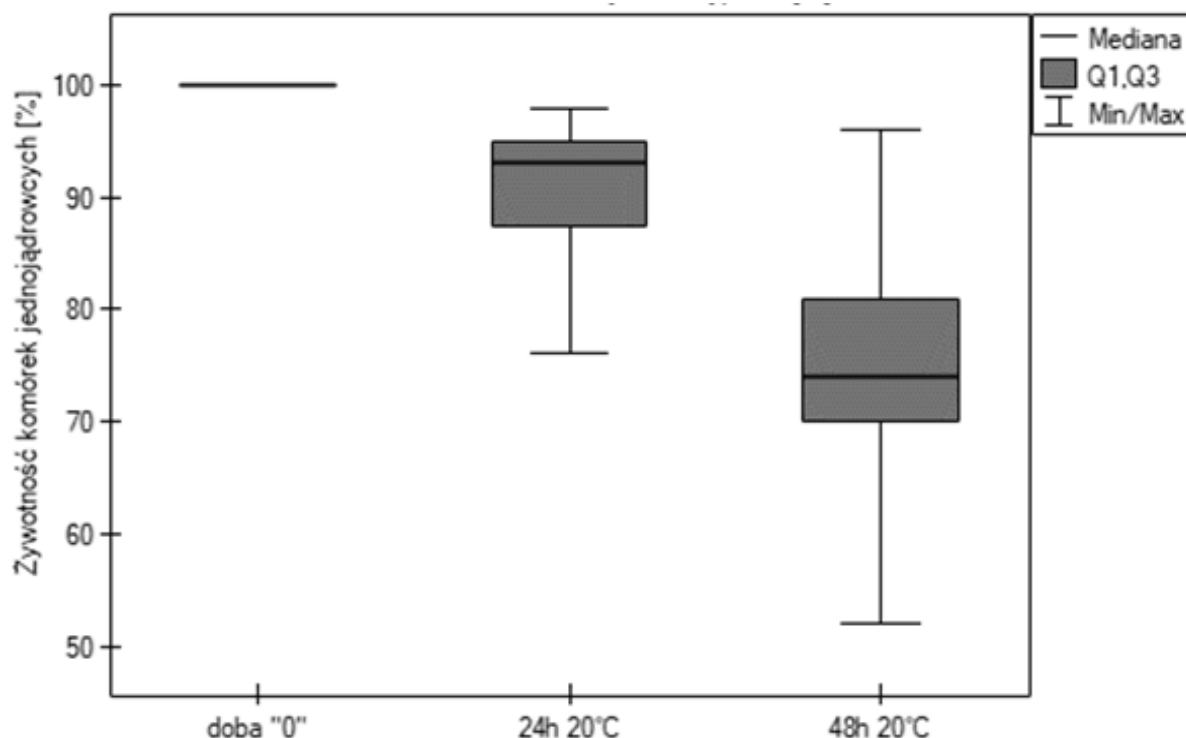
Tabela 28. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.8 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 26 i na wykresie 18 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenianych przed zamrożeniem w materiale przechowywanym 24h i 48h w 20°C. Żywotność komórek jednojądrowych ocenianych w teście z błękitem trypanu w materiale przechowywanym w 20°C uległa istotnemu statystycznie zmniejszeniu wraz z czasem przechowywania. W tabeli 27 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w kolejnych dobach przechowywania materiału w 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice stwierdzono między wszystkimi porównywanymi grupami.

	Żywotność komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 20°C [%]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	100	100	100	100	<0,000001
24h	93	90,81 ± 5,84	76	98	
48h	74	74,1 ± 9,64	52	96	

Tabela 29. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 18. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

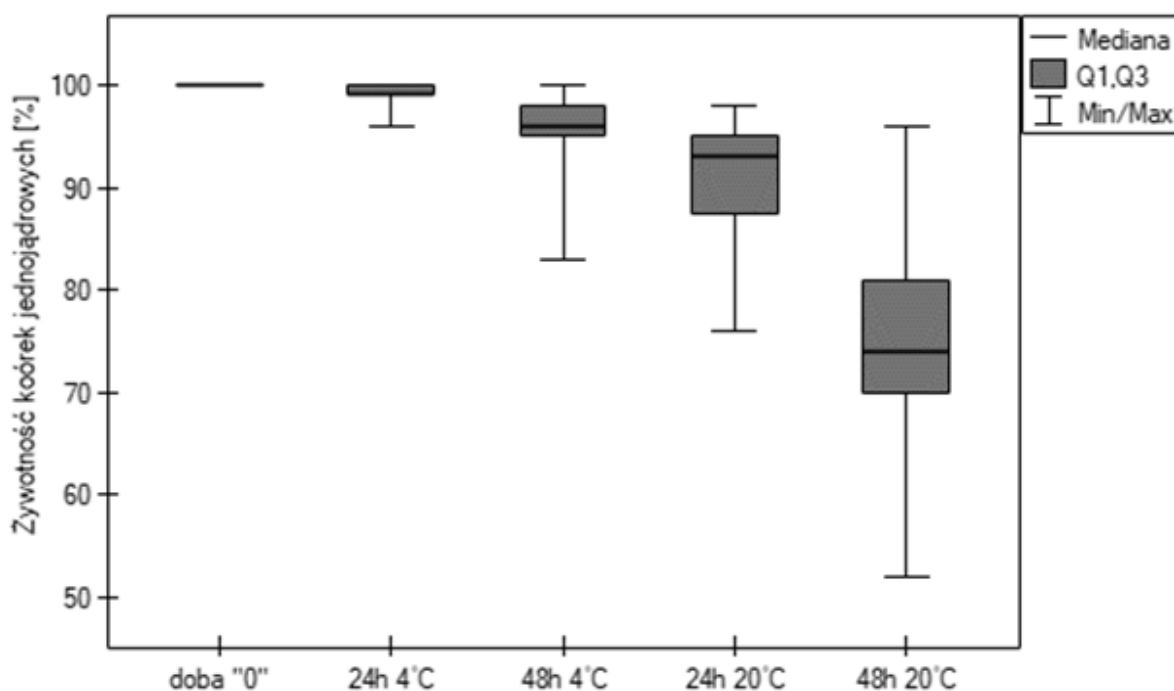
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”		0,000248	<0,000001
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,000248		0,000248
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,000248	

Tabela 30. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 28 i na wykresie 19 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Żywotność komórek jednojądrowych ocenianych w materiale przed zamrożeniem w teście z błękitem trypanu ulega istotnemu statystycznie zmniejszeniu wraz z czasem przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.

	Żywotność komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C i 20 °C [%]				
Przechowywanie w 4 °C i 20 °C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
dobą „0”	100	100	100	100	<0,000001
24h 4 °C	99	99,13 ± 1,02	96	100	
48h 4 °C	96	95,97 ± 3,11	83	100	
24h 20 °C	93	90,81 ± 5,84	76	98	
48h 20 °C	74	74,1 ± 9,64	52	96	

Tabela 31. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4 °C i 20 °C



Wykres 19. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4 °C i 20 °C

4.3.9 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 29 i na wykresie 20 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenianym po rozmrożeniu w materiale krioprezerwowanym w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Mediana żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C przez 24h i 48h wynosi odpowiednio 84%, 82% oraz 79%, różnice są istotne statystycznie.

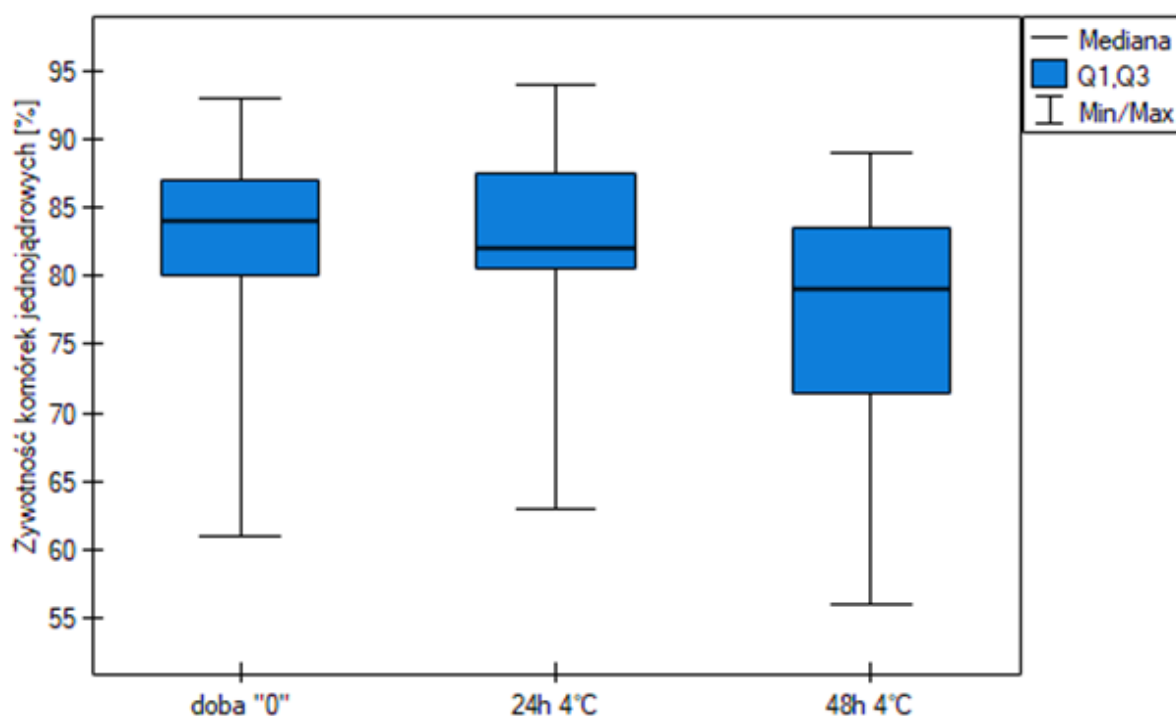
	Żywotność komórek jednojądrowych po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 4°C [%]				
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
doba „0”	84	82,64± 7,06	61	93	0,002542
24h	82	82,84± 6,73	63	94	
48h	79	77,42± 8,48	56	89	

Tabela 32. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 30 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych ocenianych po rozmrożeniu w materiale w kolejnych dobach przechowywania w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice stwierdzono w porównaniu materiału krioprezerwowanego w dniu aferezy i przechowywanego 48h, oraz między materiałem po 24 h przechowywania i 48h przechowywania ($p < 0,05$).

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”		1	0,039803
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	1		0,003605
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,039803	0,003605	

Tabela 33. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 20. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.10 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

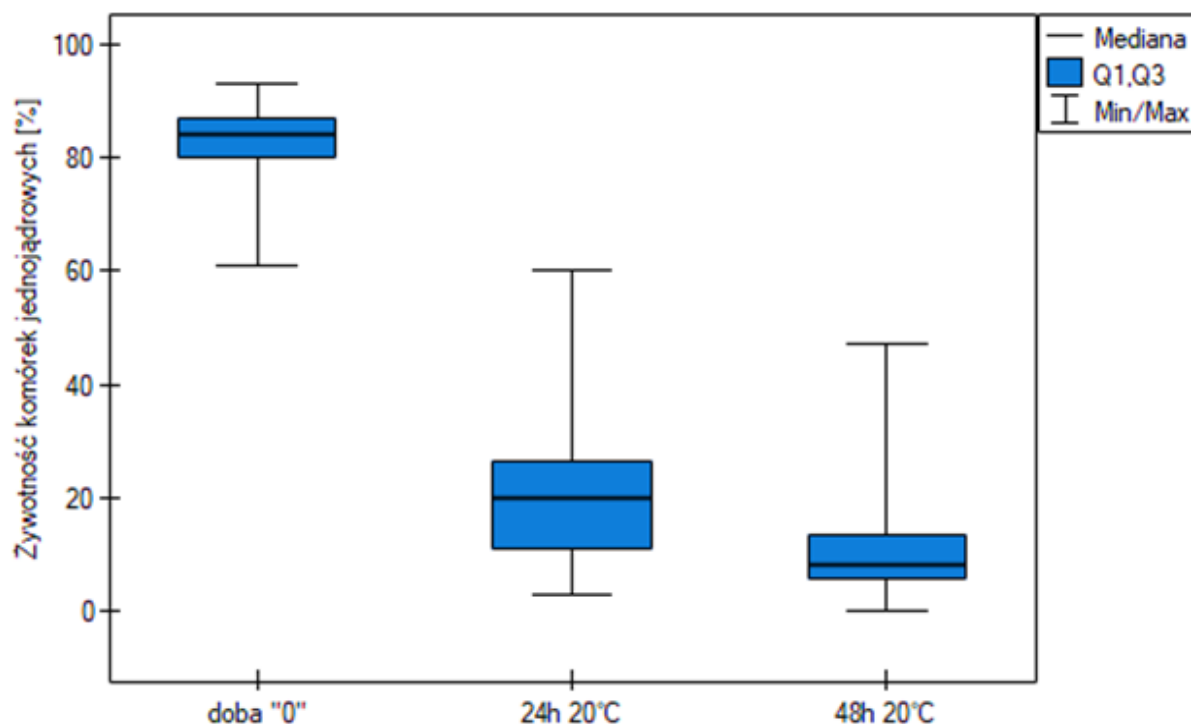
W tabeli 32 i na wykresie 21 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 20°C. Żywotności komórek jednojądrowych ocenianych po rozmrożeniu w teście z błękitem trypanu w materiale przechowywanym w 20°C przez 24h i 48h wynoszą odpowiednio 84%, 20% oraz 8%. Różnice są istotne statystycznie ($p < 0,05$). W tabeli 31 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w kolejnych dobach przechowywania materiału (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Stwierdzono istotne statystycznie różnice między wszystkimi porównywanymi grupami.

	Żywotność komórek jednojądrowych po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 20°C [%]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	84	82,64± 7,06	61	93	<0,00001
24h	20	21,29± 15,5	3	60	
48h	8	10,61±8,85	0	47	

Tabela 34. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Żywotność komórek jednojądrowych [%] doba „0”		0,000014	<0,000001
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,000014		0,022959
Żywotność komórek jednojądrowych [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,022959	

Tabela 35. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



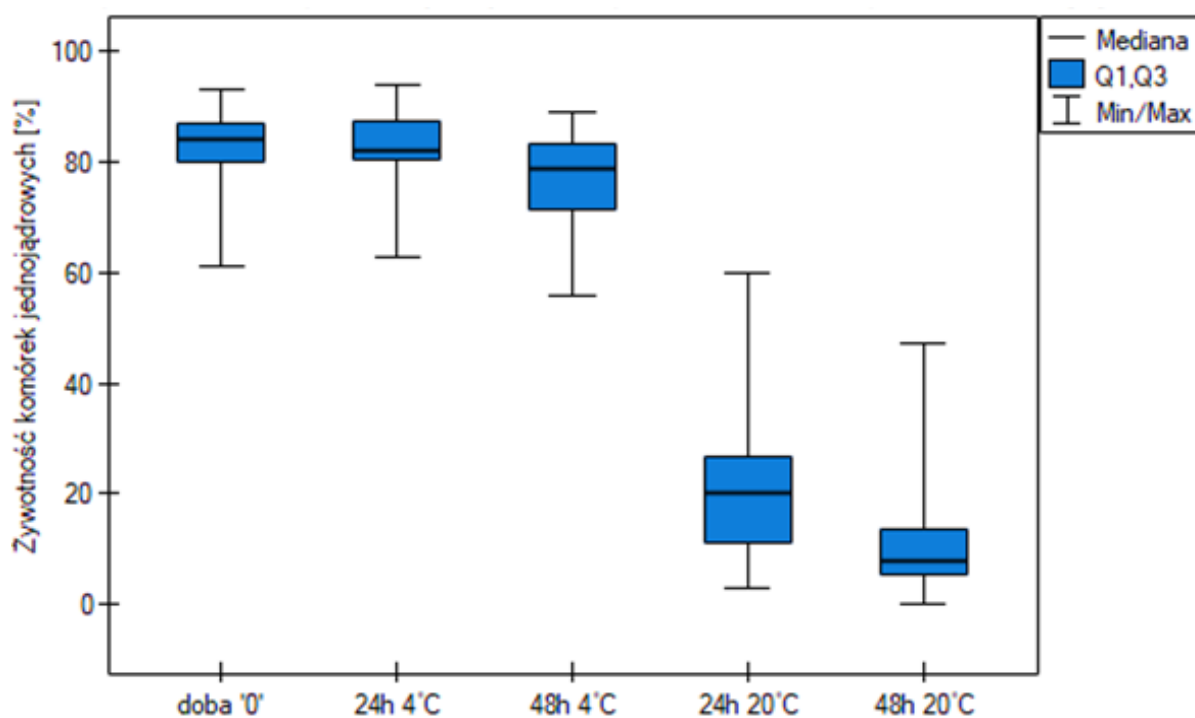
Wykres 21. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

4.3.11 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h

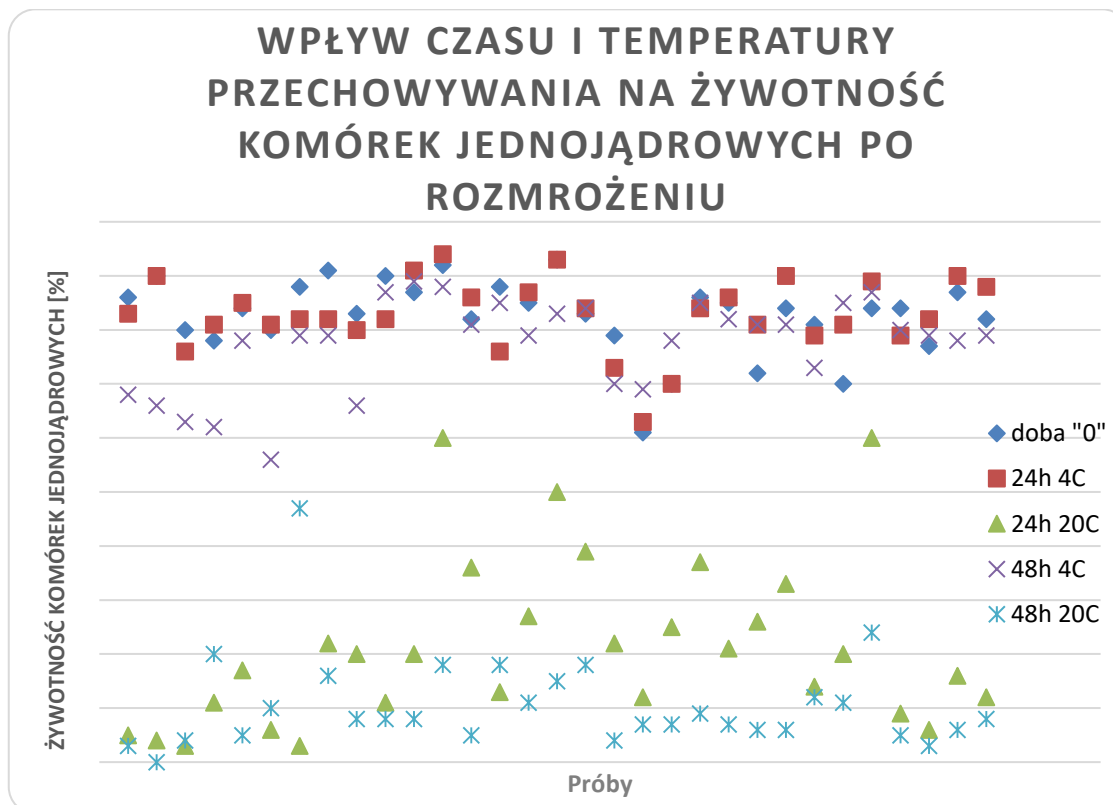
W tabeli 33 i na wykresie 22 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C i 20°C. Stwierdzono istotny statystycznie spadek żywotności komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu ocenianych po rozmrożeniu w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w temperaturze 4°C i 20°C.

	Żywotność komórek jednojądrowych w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4°C i 20°C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	84	82,64± 7,06	61	93	<0,000001
24h 4°C	82	82,84± 6,73	63	94	
48h 4°C	79	77,42± 8,48	56	89	
24h 20°C	20	21,29± 15,5	3	60	
48h 20°C	8	10,61±8,85	0	47	

Tabela 36 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 22. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 23. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na żywotność komórek jednojądrowych po rozmrożeniu- analiza poszczególnych prób

Na wykresie 23 przedstawiono porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenianych po rozmrożeniu w kolejnych dobach przechowywania w 4°C i 20°C. Wszystkie zaznaczone na wykresie 23 punkty dotyczą analogicznie kolejnych prób oznaczanych w różnych badanych warunkach związanych z temperaturą (4°C i 20°C) oraz czasem przechowywania (doba „0”, 24h i 48h). Zauważalny rozrzut wyników jest widoczny w obrębie prób rozmrożonych oraz przechowywanych przez 24h w 20°C.

4.3.12 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych przed zamrożeniem metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 34 i na wykresie 24 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C. Żywotność komórek CD34+ w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C oceniona przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem 7-AAD była na wysokim poziomie, różnice były istotne statystycznie. W tabeli 35 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w kolejnych dobach przechowywania w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Nie stwierdzono istotnych

statystycznie różnic w materiale ocenianym w dobie „0” i po 24h przechowywania. Pozostałe porównania wskazują istotne statystycznie różnice.

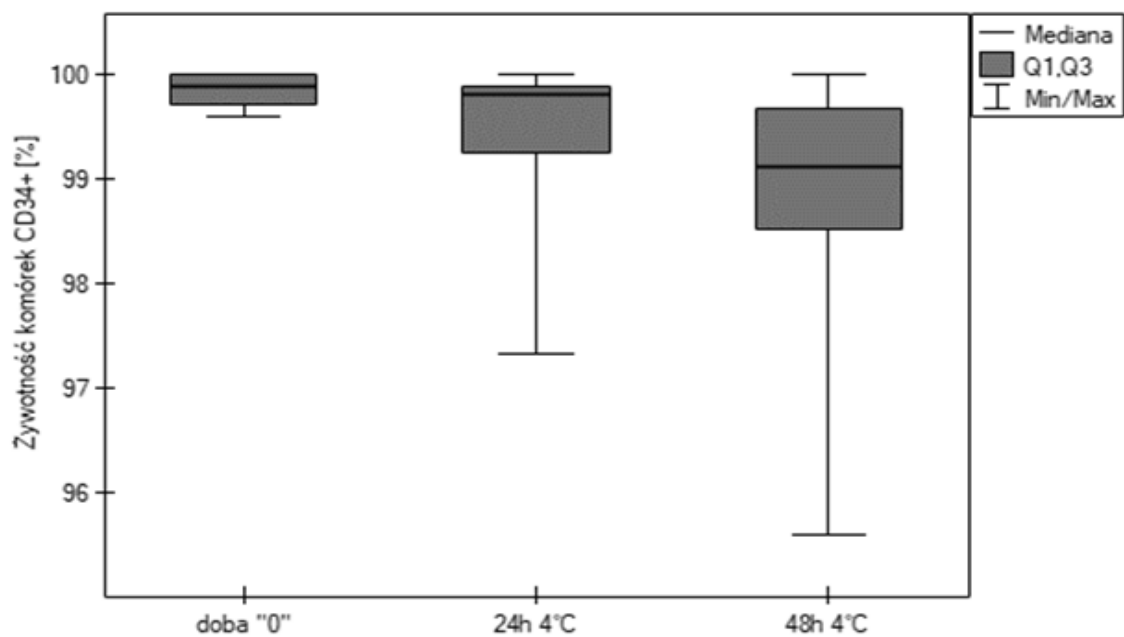
Żywotność komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C [%]					
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	99,89	99,85± 0,14	99,6	100	<0,000001
24h	99,8	99,43± 0,73	97,32	100	
48h	99,12	98,95± 0,97	95,60	100	

Tabela 37. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic żywotności komórek CD34+ w materiale ocenionym w dobie „0” w porównaniu z materiałem przechowywanym 24h w 4°C.

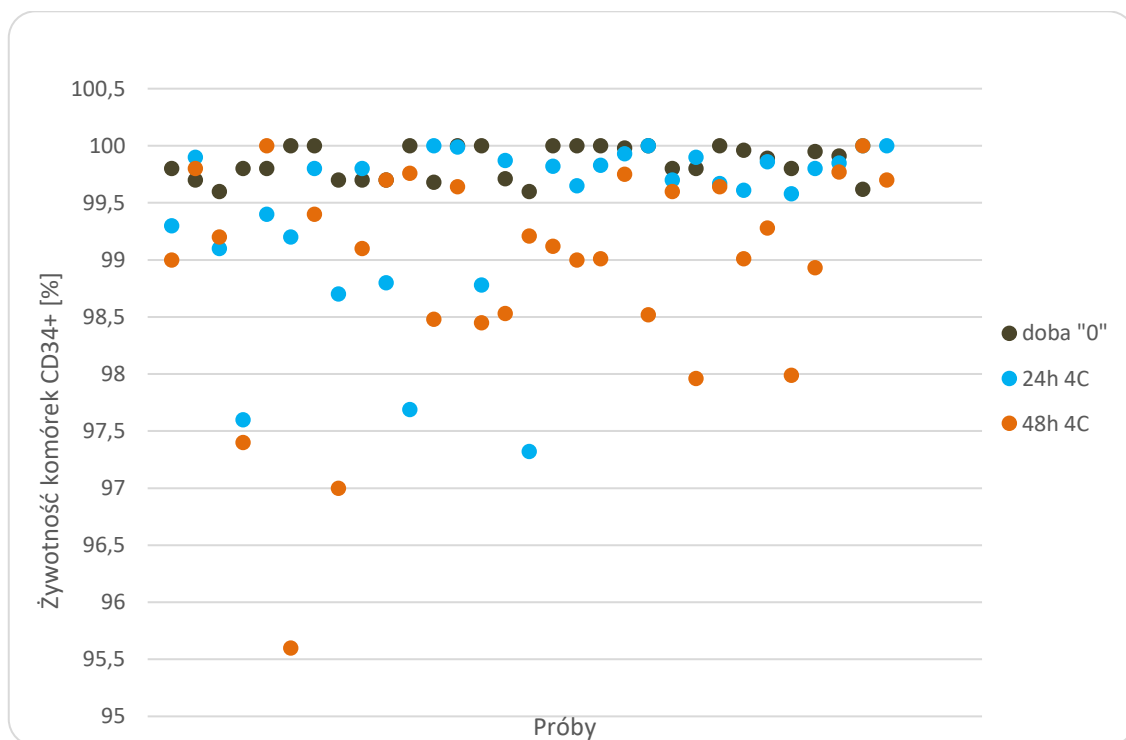
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”		0,066762	<0,000001
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,066762		0,006911
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	<0,000001	0,006911	

Tabela 38. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 24. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Na wykresie 25 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w poszczególnych próbach w kolejnych dniach przechowywania materiału w 4°C i 20°C.



Wykres 25. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób

4.3.13 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 36 i na wykresie 26 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianym przed zamrożeniem w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 20°C. Żywotność komórek CD34+ ocenionych metodą cytometrii przepływowej z 7 - AAD w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w temperaturze 20°C uległy znacznemu zmniejszeniu, różnice były istotne statystycznie. Wartość żywotności znacząco obniża się po 48h przechowywania.

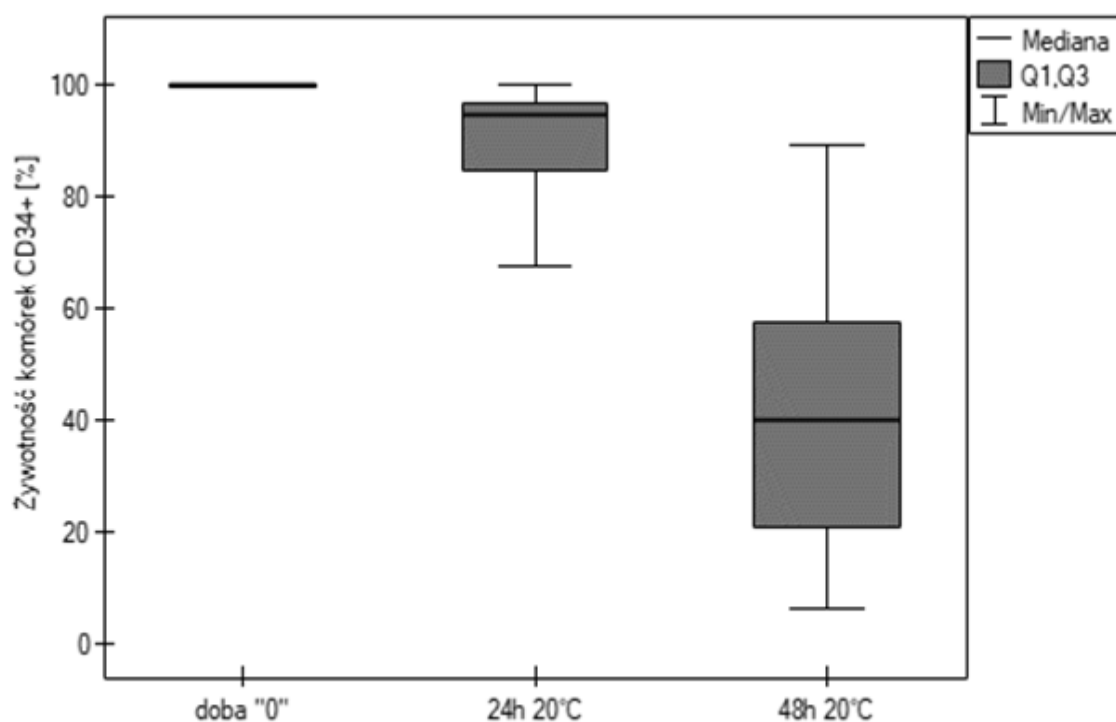
	Żywotność komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 20°C [%]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	99,89	99,85± 0,14	99,6	100	<0,000001
24h	94,71	90,55± 9,11	67,7	100	
48h	40,06	40,03± 22,99	6,7	89,36	

Tabela 39. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 37 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w kolejnych dobach przechowywania materiału w 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Stwierdzono istotne statystycznie różnice żywotności komórek CD34+ we wszystkich porównywanych grupach.

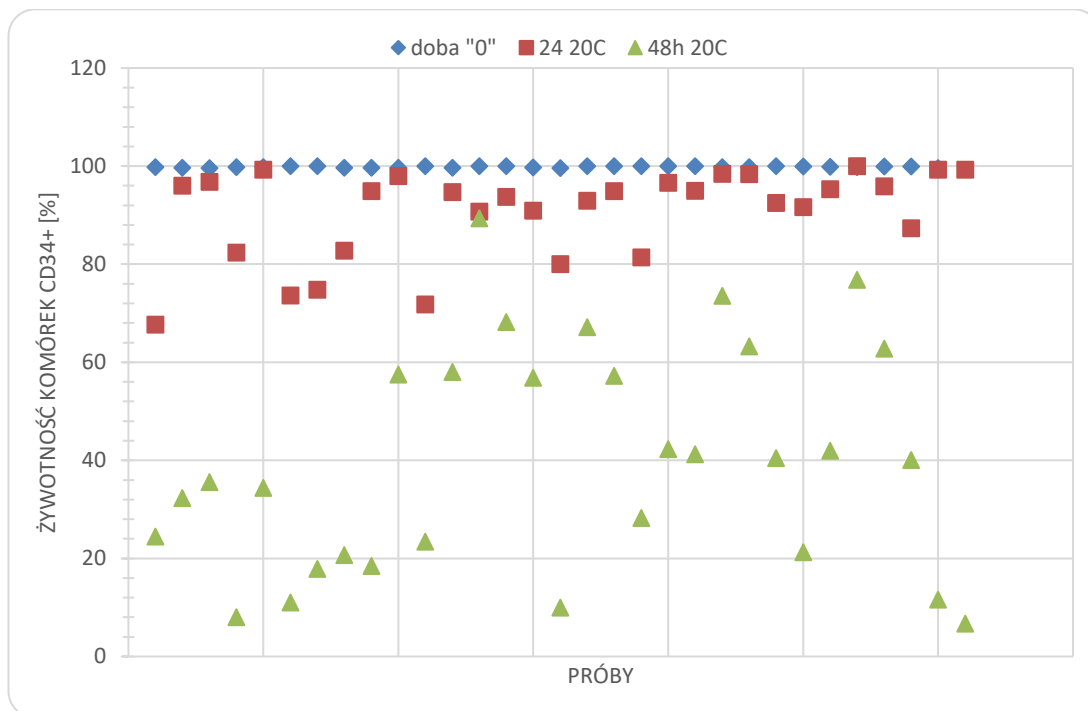
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”		0,000692	<0,000001
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,000692		0,000145
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,000145	

Tabela 40. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 26. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Na wykresie 27 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w poszczególnych próbach w kolejnych dniach przechowywania materiału w 20°C. Duży rozrzut wartości żywotności można zaobserwować po 48h przechowywania.



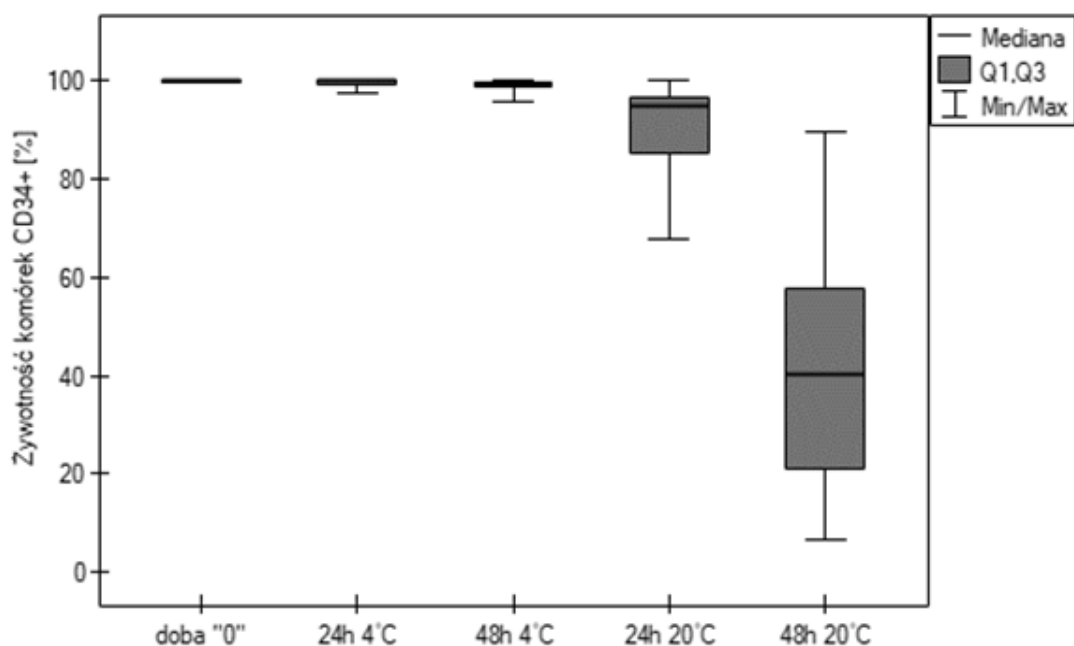
Wykres 27. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób

4.3.14 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w świeżym materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C po 24h i 48h

Stwierdzono istotne statystycznie różnice żywotności komórek CD34+ w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w temperaturze 4°C i 20°C.

	Żywotność komórek CD34+ w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C i 20°C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	99,89	99,85± 0,14	99,6	100	<0,000001
24h 4°C	99,8	99,43± 0,73	97,32	100	
48h 4°C	99,12	98,95± 0,97	95,60	100	
24h 20°C	94,71	90,55± 9,11	67,7	100	
48h 20°C	40,06	40,03± 22,99	6,7	89,36	

Tabela 41. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 28. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.15 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 39 i na wykresie 29 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ oceniane po rozmrożeniu po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C. Można zaobserwować znacznie odbiegającą wartość minimalną po 48h przechowywania.

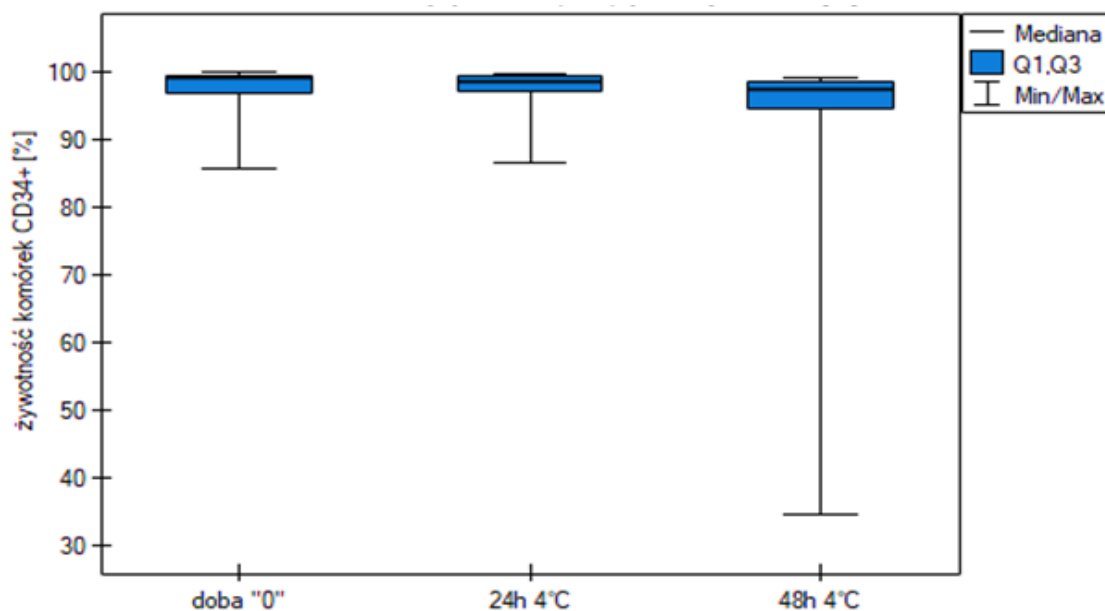
	Żywotność komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 4°C [%]				
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
dobę „0”	99,21	97,71 ±3,40	85,8	100	0,511891
24h	98,53	97,32 ±3,28	86,6	99,7	
48h	97,54	92,25 ±14,34	34,5	99,18	

Tabela 42. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 40 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ po oceniane po rozmrożeniu w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice żywotności komórek CD34+ nie występują między próbami ocenianymi w dobie „0” i przechowywanymi przez 24h w 4°C. Porównanie pozostałych grup wskazuje na istotne statystycznie różnice.

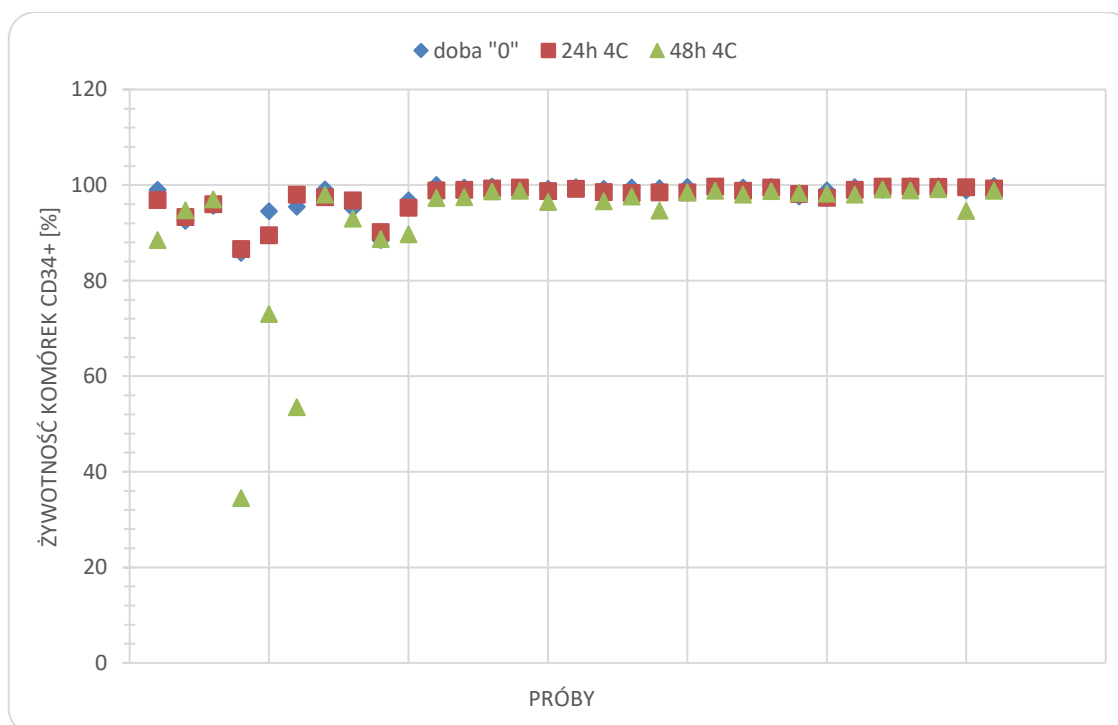
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”		0,817471	0,000046
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,817471		0,003746
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,000046	0,003746	

Tabela 43. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 29. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Na wykresie 30 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w poszczególnych próbach, w materiale ocenianym po rozmrożeniu po 34h i 48h przechowywania w 4°C.



Wykres 30. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób

4.3.16 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 41 i na wykresie 31 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu przechowywanym przez 24h i 48h w 20°C. Żywotność komórek CD34+ oceniana metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD w materiale przechowywanym w 20°C przez 24h i 48h uległa bardzo znacznemu obniżeniu ($p < 0,05$).

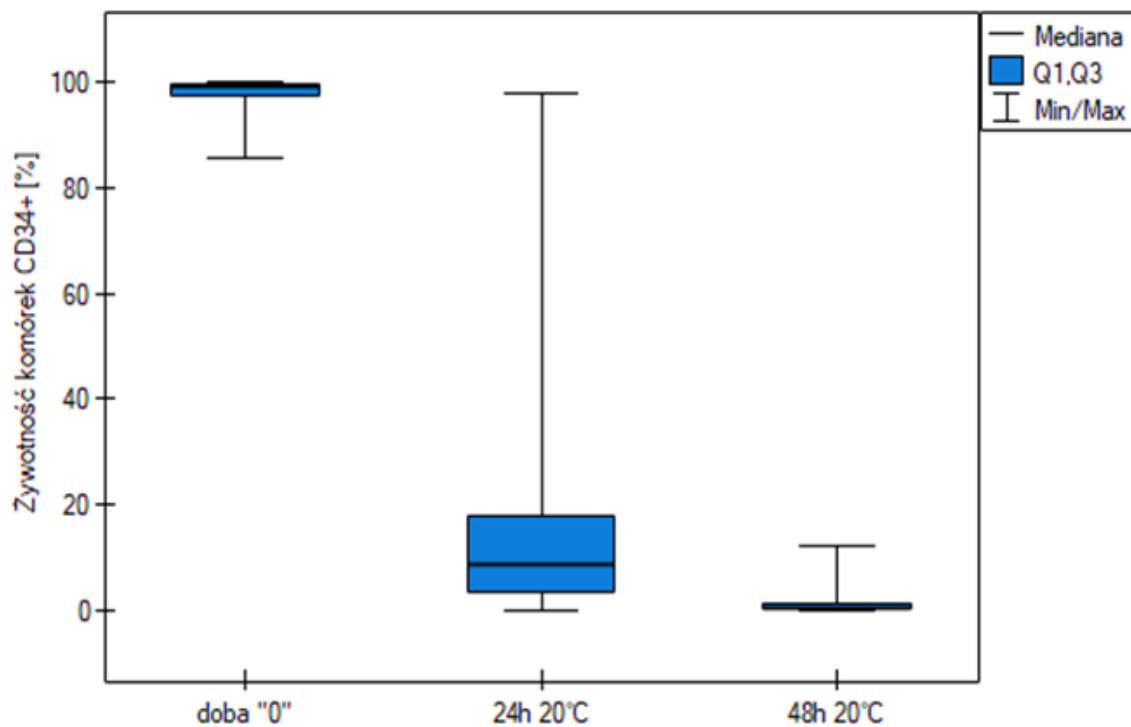
	Żywotność komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 20°C [%]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	99,21	97,71 ±3,40	85,8	100	<0,000001
24h	8,6	13,77 18,3	0	97,83	
48h	0,53	1,35 2,45	0	12,1	

Tabela 44. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 42 przedstawiono porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu po 24h i 48h przechowywania w 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Stwierdzono istotne statystycznie różnice w porównaniu żywotności komórek CD34+ między wszystkimi grupami.

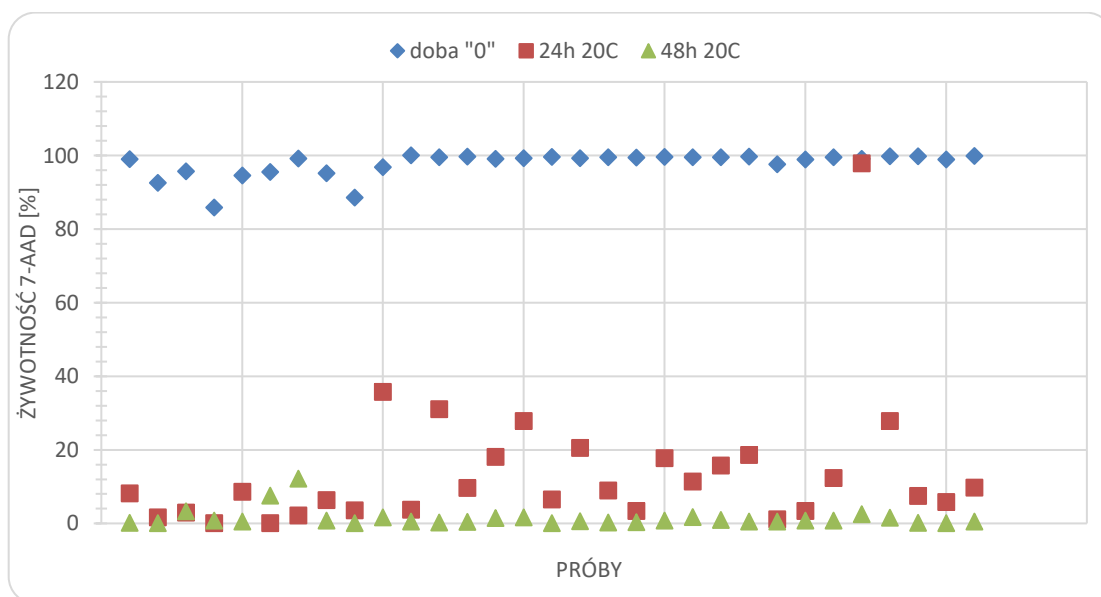
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Żywotność komórek CD34+ [%] doba „0”		0,000026	<0,000001
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,000026		0,010467
Żywotność komórek CD34+ [%] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,010467	

Tabela 45. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 31. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Na wykresie 32 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+, w poszczególnych próbach, w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 20°C. Można zaobserwować znaczące różnice żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym w dobie „0” oraz w kolejnych dobach przechowywania.



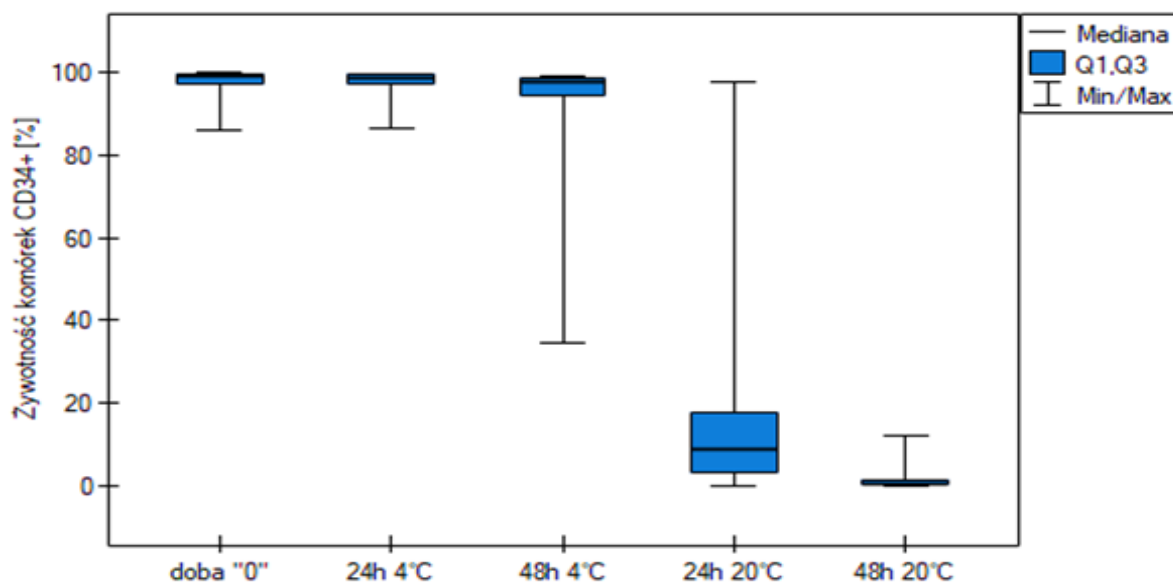
Wykres 32. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C - analiza poszczególnych prób

4.3.17 Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenianych metodą cytometrii przepływowej z 7-AAD po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 43 i na wykresie 33 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD4+ ocenianych po rozmrożeniu w materiale krioprezerwowanym w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Różnica żywotności komórek CD34+ w zależności od czasu i temperatury przechowywania, ocenianym po rozmrożeniu była istotna. Najwyższą żywotność komórek CD34+ stwierdzono w materiale ocenionym w dobie „0”, natomiast najniższą w materiale przechowywanym w 20°C przez 48h.

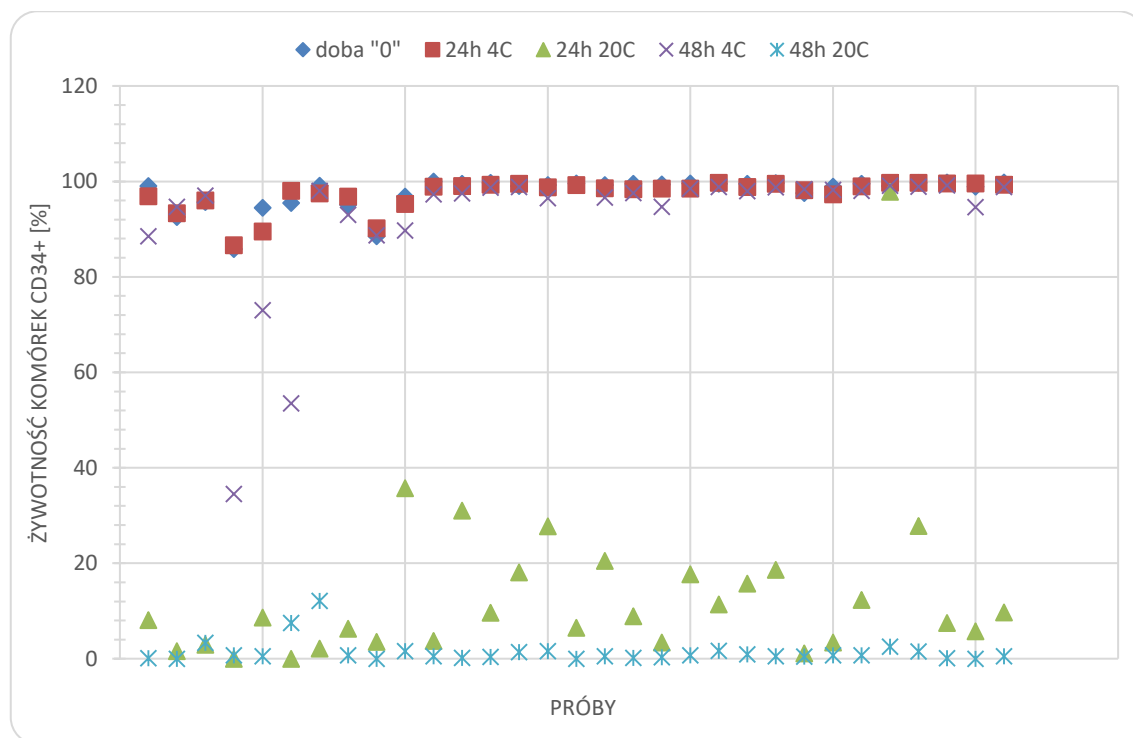
	Żywotność komórek CD34+ po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 4°C i 20°C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	99,21	97,71 ±3,40	85,8	100	<0,000001
24h 4°C	98,53	97,32 ±3,28	86,6	99,7	
48h 4°C	97,54	92,25 ±14,34	34,5	99,18	
24h 20°C	8,6	13,77 18,3	0	97,83	
48h 20°C	0,53	1,35 2,45	0	12,1	

Tabela 46. porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 33. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

Na wykresie 34 przedstawiono porównanie żywotności komórek CD34+ w poszczególnych próbach w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Na wykresie jest widoczne obniżenie żywotności komórek CD34+ w 3 próbach przechowywanych przez 48h w 4°C i znaczne obniżenie we wszystkich próbach przechowywanych w 20°C.



Wykres 34. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C - analiza poszczególnych prób

4.3.18 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 44 i na wykresie 35 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w liczbie prekursorów granulocytarno-monocytowych ocenianych metodą hodowli in-vitro w materiale ocenianym w dobie „0” oraz przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C.

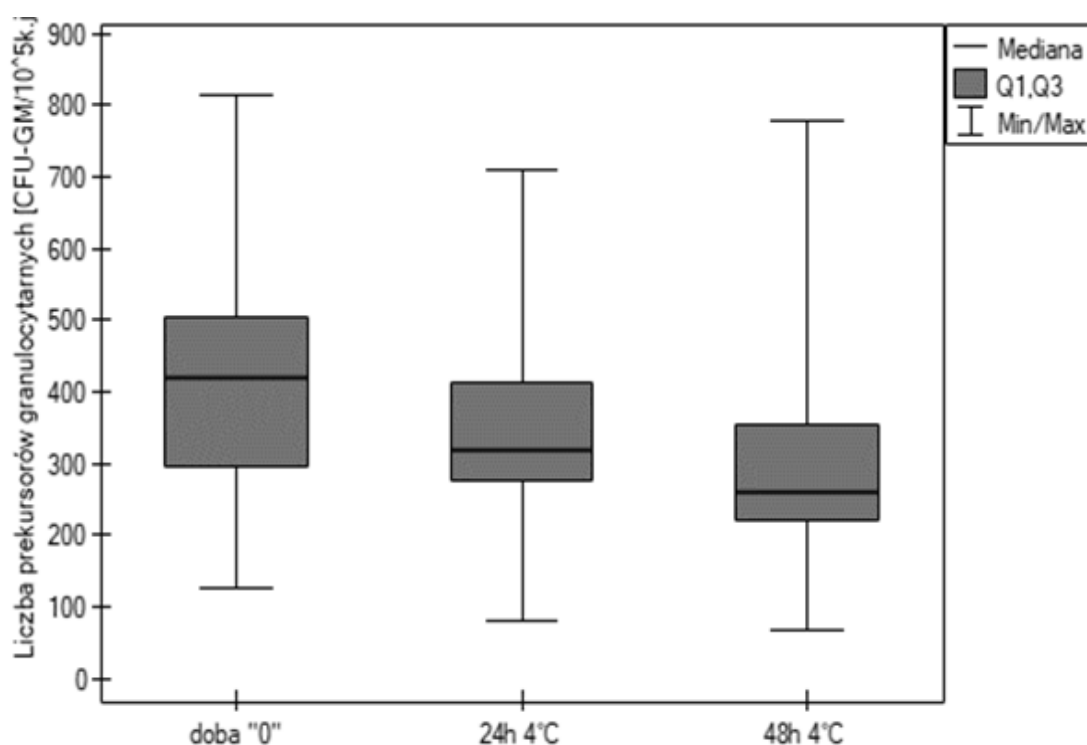
Przechowywanie w 4°C	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C [/10 ⁵ k.j]				
	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	419	417± 149	126	814	0,000081
24h	318	354± 139	82	710	
48h	260	296± 144	68	777	

Tabela 47. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 45 przedstawiono wielokrotne porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). W porównaniu między wszystkimi grupami nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w liczbie prekursorów granulocytarnych ocenianych w dobie „0” w porównaniu z materiałem przechowywanym przez 24h w 4°C. W porównaniu pozostałych grup różnice są istotne statystycznie.

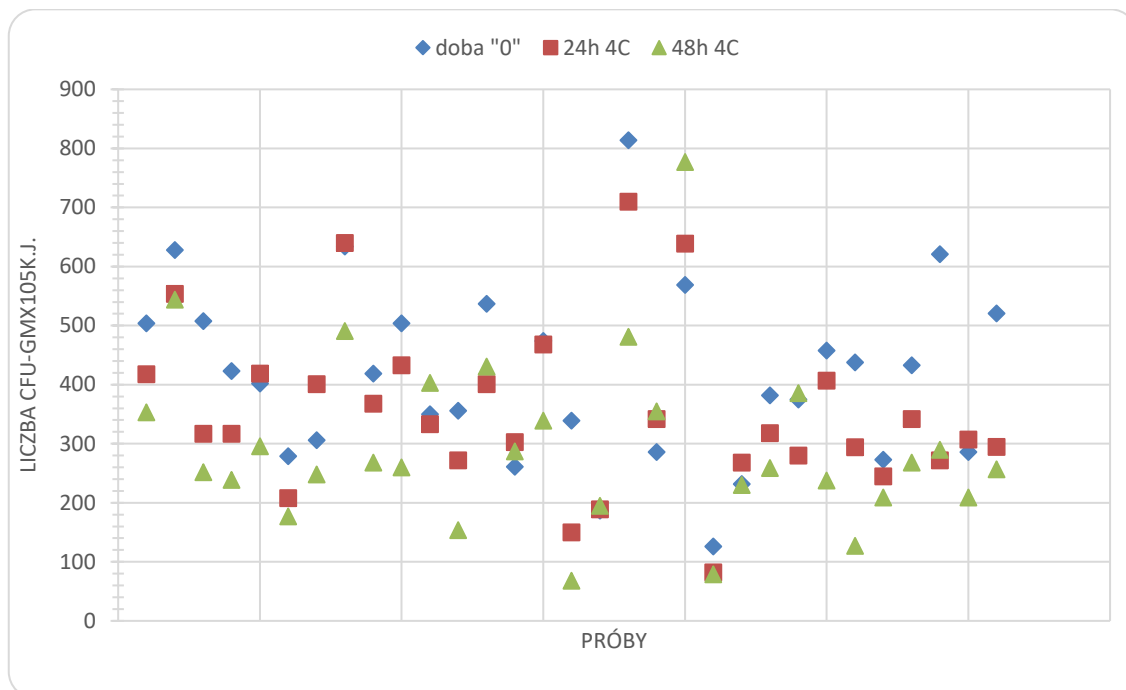
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 4°C	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 4°C
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”		0,226211	0,000047
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,226211		0,033255
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,000047	0,033255	

Tabela 48. Porównanie wielorotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 35. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Na wykresie 36 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM, w poszczególnych próbach, w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Na wykresie jest widoczne duże zróżnicowanie wyników między poszczególnymi próbkami. Liczba prekursorów w większości prób przekracza wartość 200 CFU-GM/10⁵ k.j..



Wykres 36. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób

4.3.19 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 46 i na wykresie 37 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. Liczba prekursorów granulocytarno-monocytowych ocenianych metodą in vitro w dobie „0” oraz w materiale przechowywanym w 20°C przez 24h i 48h ulega istotnemu statystycznie zmniejszeniu. Mediana liczby prekursorów wynosi odpowiednio 419, 83 oraz 0.

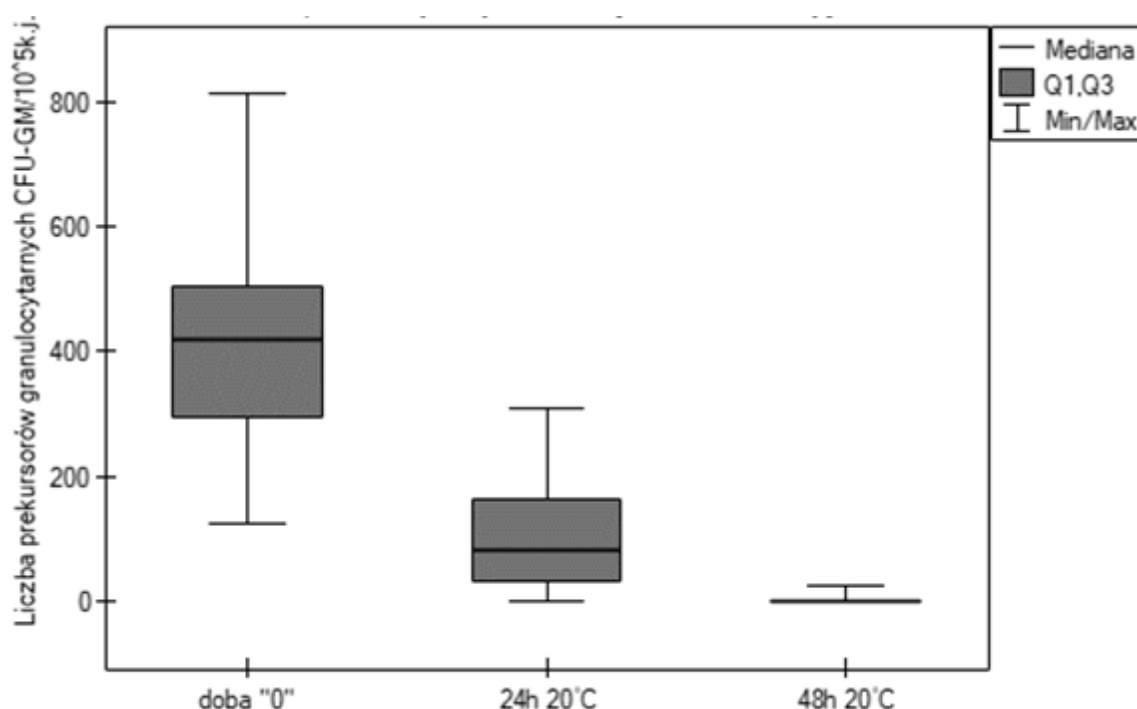
	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 20°C [/10 ⁵ k.j.]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	419	417± 149	126	814	<0,000001
24h	83	104± 91	0	311	
48h	0	2± 5	0	25	

Tabela 49. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 47 przedstawiono porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). W porównaniu wszystkich grup stwierdzono istotne statystycznie różnice liczby prekursorów granulocytarnych w materiale ocenianym w dobie „0” oraz przechowywanym w temperaturze 20°C przez 24h i 48h.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 20°C	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 20°C
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”		0,00019	<0,000001
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,00019		0,000417
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,000417	

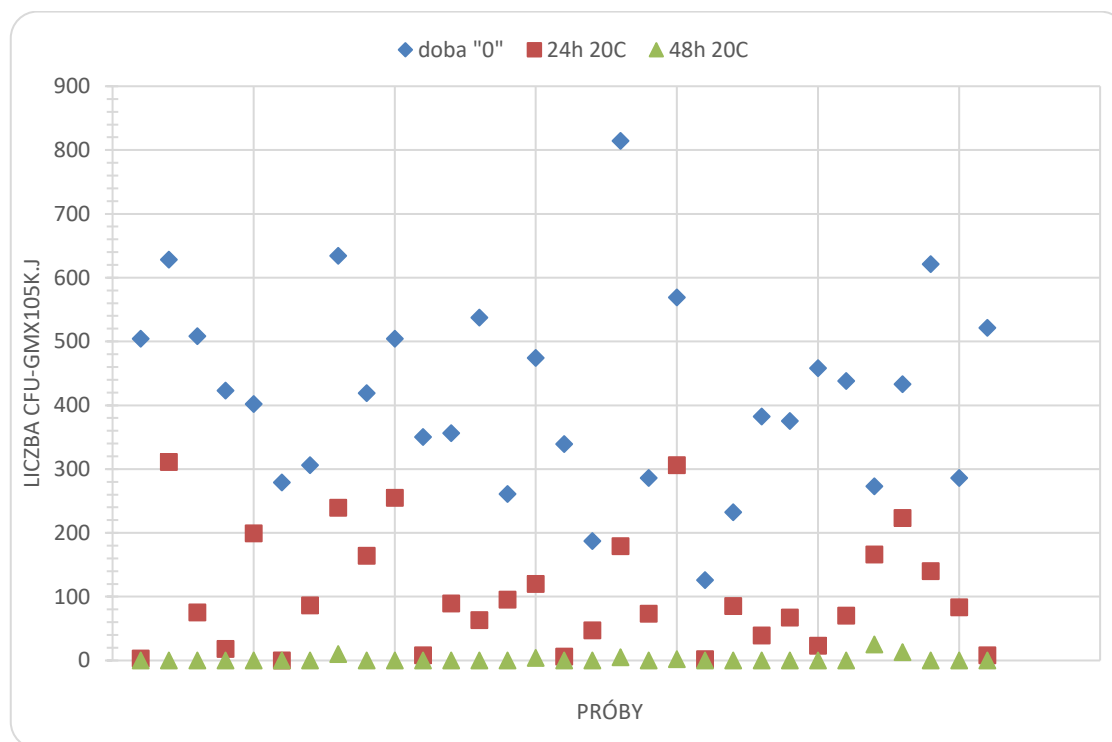
Tabela 50. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 37. Wykres ramka-wąsy -porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Na wykresie 38 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w poszczególnych próbach w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0”

oraz po 24h i 48h przechowywania w 20°C. Na wykresie jest widoczny duży rozrzut wyników między liczbą prekursorów CFU-GM w poszczególnych próbach. Liczba prekursorów CFU-GM w kolejnych dobach przechowywania ulega znacznemu obniżeniu. Po 24h przechowywania w 20°C pojedyncze uzyskiwane wyniki sięgają wartości bliskich zeru.



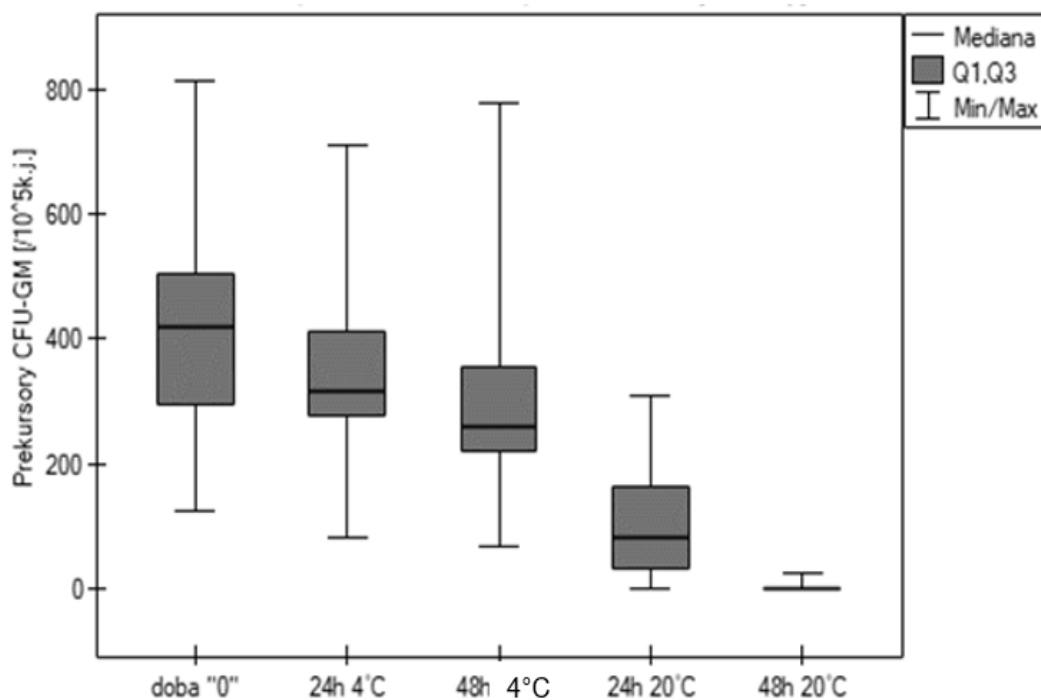
Wykres 38. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób

4.3.20 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 48 i na wykresie 39 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w materiale w dniu aferezy oraz przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C i 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w liczbie prekursorów granulocytarnych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i 20°C przez 24h i 48h. Mediana liczby prekursorów granulocytarnych maleje wraz z upływem czasu, jest znacząco niższa w temperaturze 20°C niż 4°C.

	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C w w 20°C [10 ⁵ k.j]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	419	417± 149	126	814	<0,000001
24h 4°C	318	354± 139	82	710	
48h 4°C	260	296± 144	68	777	
24h 20°C	83	104± 91	0	311	
48h 20°C	0	2± 5	0	25	

Tabela 51. porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 39. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.21 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ k.j. po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 49 i na wykresie 40 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu krioprezerwowanym w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Liczba prekursorów granulocytarno-monocytowych ocenianych przy użyciu hodowli in-vitro w materiale po rozmrożeniu, w dobie „0” oraz przechowywanych przed zamrożeniem w 4°C przez 24h i 48h uległa istotnemu statystycznie zmniejszeniu.

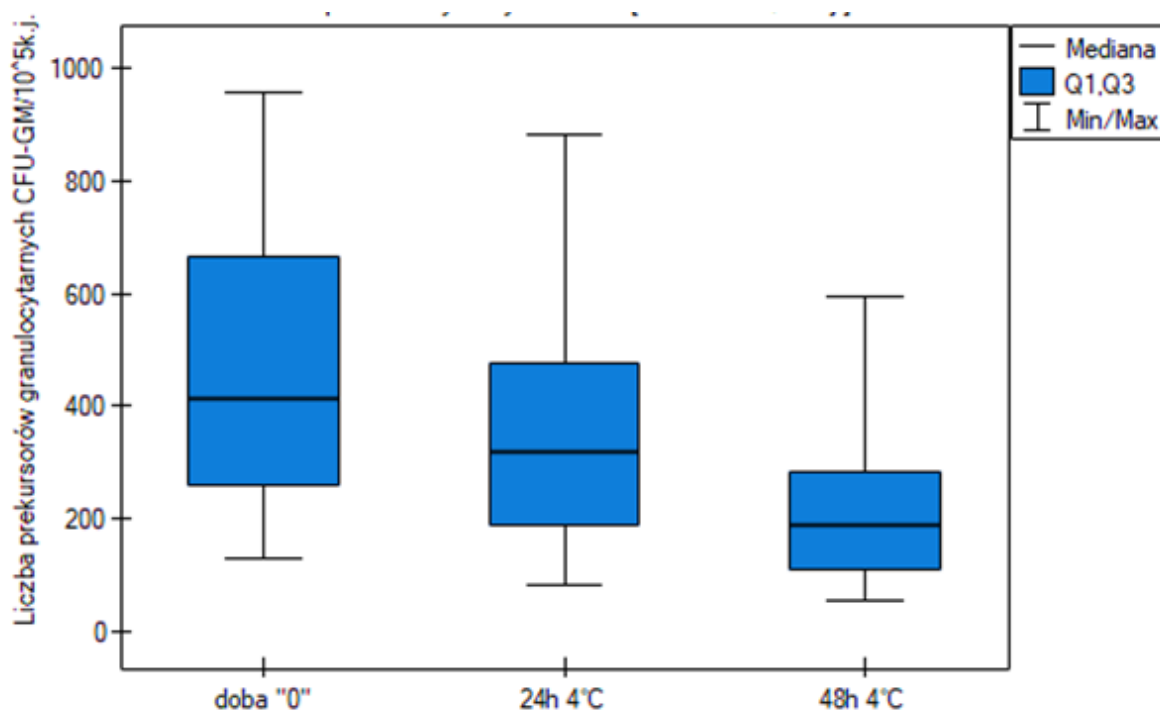
	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4°C [/10 ⁵ k.j]				
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	414	459± 236	129	957	<0,000001
24h	320	348± 203	80	881	
48h	190	228± 154	54	105	

Tabela 52. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 50 przedstawiono porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu krioprezerwowanym w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Stwierdzono istotne statystycznie różnice liczby prekursorów CFU-GM między wszystkimi porównywanymi grupami ($p < 0,05$).

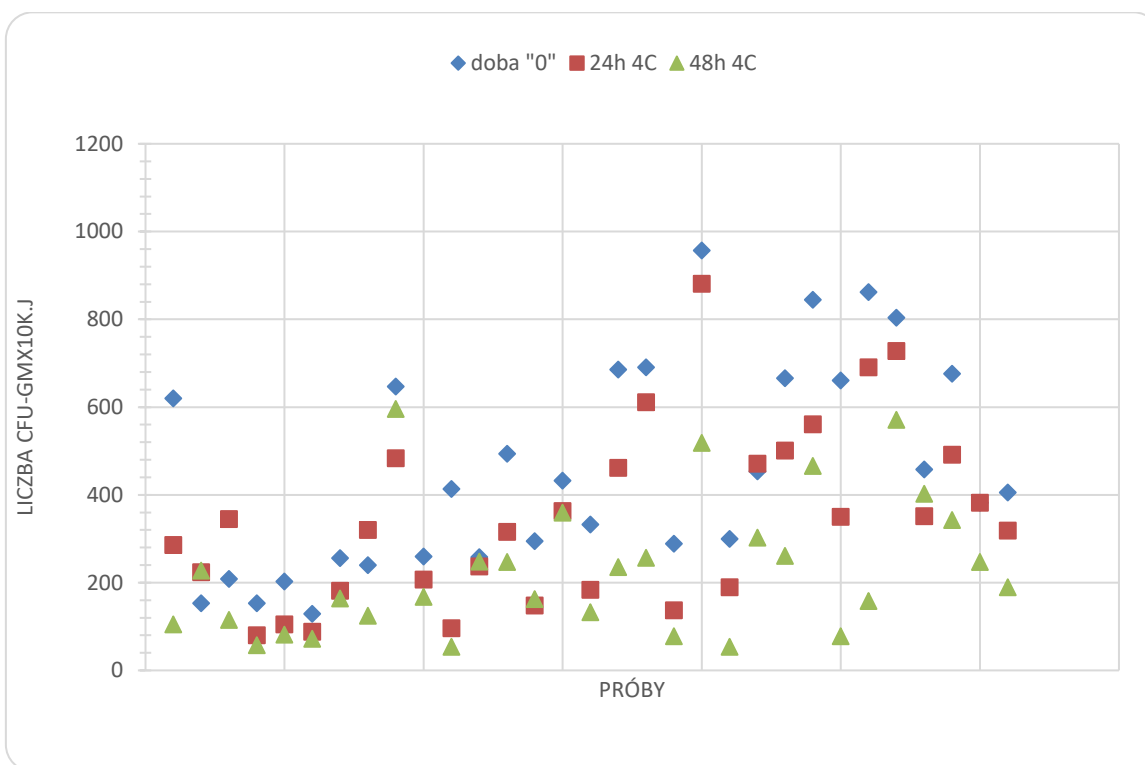
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 4°C	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 4°C
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”		0,00288	<0,000001
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,00288		0,005584
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 4°C	<0,000001	0,005584	

Tabela 53. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 40. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

Na wykresie 41 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM, w poszczególnych próbach, w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.



Wykres 41. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób

4.3.22 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ komórek jednojądrowych po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 51 i na wykresie 42 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. Liczba prekursorów CFU-GM oceniana przy użyciu hodowli in-vitro po rozmrożeniu w materiale przechowywanym przed zamrożeniem w 20°C przez 24h i 48h uległa istotnemu statystycznie zmniejszeniu. W materiale poddanym krioprezewacji w dobie „0” mediana liczby prekursorów granulocytarnych wynosiła 411, w materiale przechowywanym przez 24h wynosiła 6, natomiast po 48h - 0.

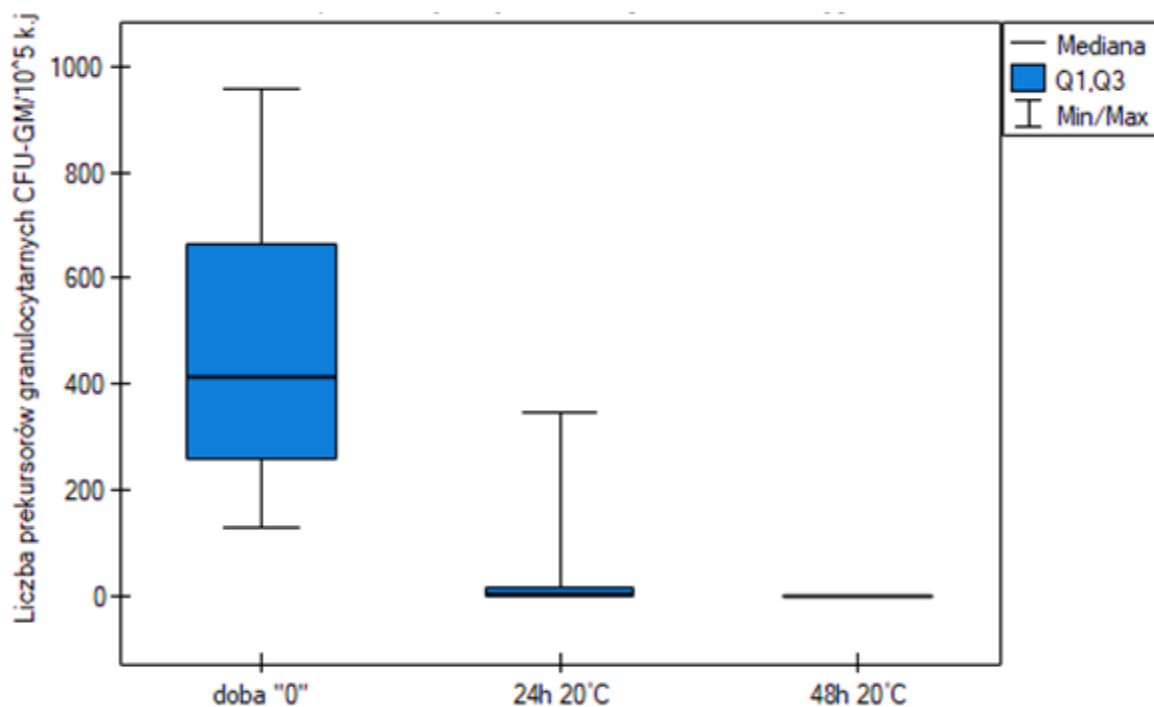
	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 20°C [/10 ⁵ k.j]				
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	414	459± 236	129	957	<0,000001
24h	6	32± 71	0	346	
48h	0	0	0	2	

Tabela 54. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 52 przedstawiono porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice liczby CFU-GM stwierdzono między wszystkimi porównywanymi grupami.

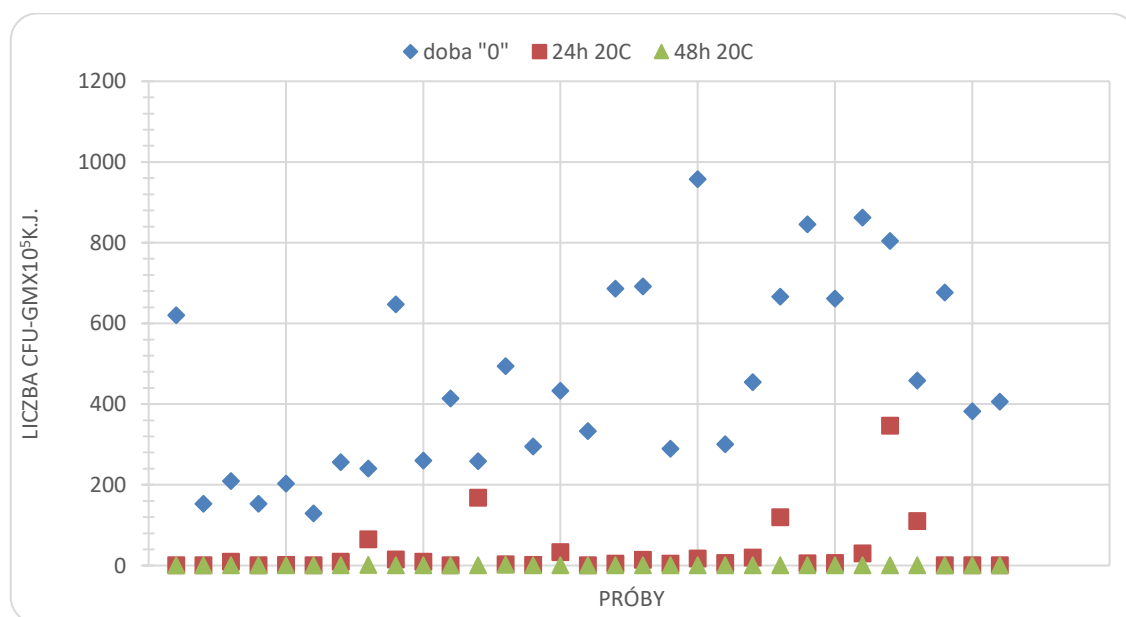
Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 20°C	liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 20°C
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. doba „0”		0,00002	<0,000001
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,00002		0,015618
liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. czas przechowywania 48h w temp. 20°C	<0,000001	0,015618	

Tabela 55. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



Wykres 42. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

Na wykresie 43 przedstawiono Porównanie liczby prekursorów CFU-GM, w poszczególnych próbach, w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. Wartości liczby prekursorów po 24h i 48h przechowywania są bliskie 0.



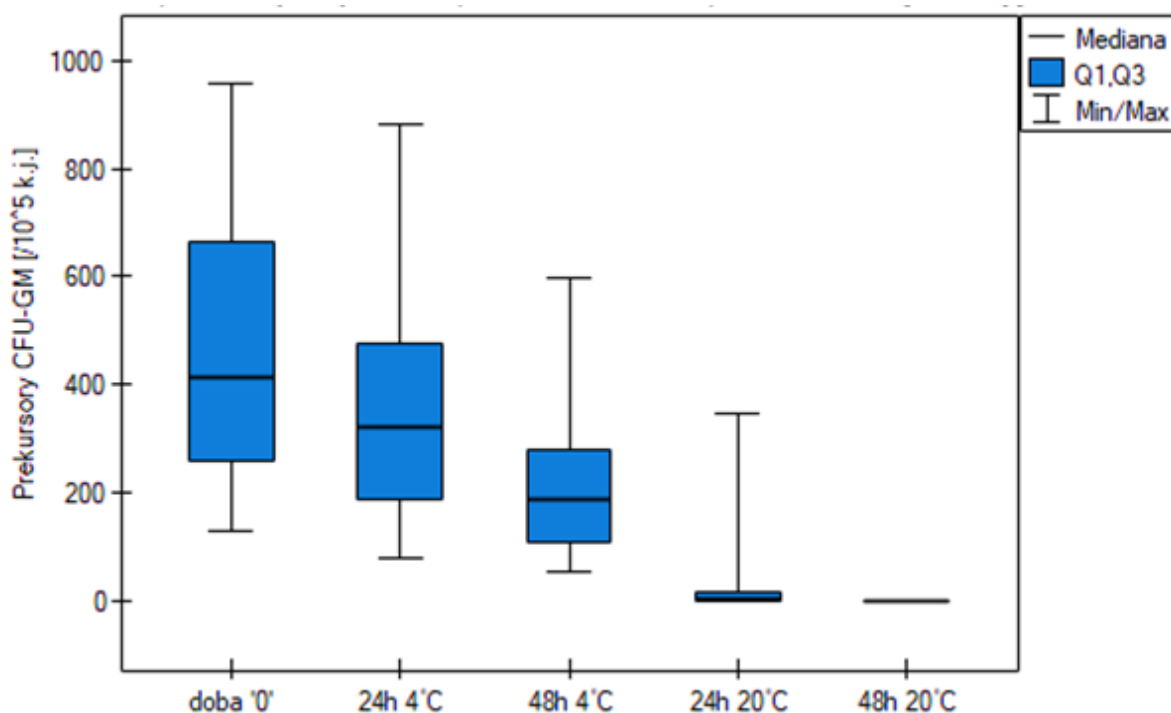
Wykres 43. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C - analiza poszczególnych prób

4.3.23 Porównanie liczby CFU-GM/10⁵ k.j. po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 53 i na wykresie 44 przedstawiono porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Liczba prekursorów granulocytarnych oceniana na podstawie hodowli in-vitro uległa istotnemu statystycznie zmniejszeniu w materiale ocenianym po rozmrożeniu, poddanym krioprezerwacji w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C przez 24h i 48h i w 20°C przez 24h i 48h.

	Liczba CFU-GM/10 ⁵ k.j. w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4°C i w 20°C [/10 ⁵ k.j]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	414	459± 236	129	957	<0,000001
24h 4°C	320	348± 203	80	881	
48h 4°C	190	228± 154	54	105	
24h 20°C	6	32± 71	0	346	
48h 20°C	0	0	0	2	

Tabela 56. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 44. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.24 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 54 i na wykresie 45 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C. Całkowita liczba komórek jednojądrowych oceniona przy pomocy analizatora hematologicznego w dobie „0” oraz w materiale przechowywanym w temperaturze 4°C przez 24h i 48h uległa nieznacznemu zmniejszeniu, różnice nie były istotne statystycznie.

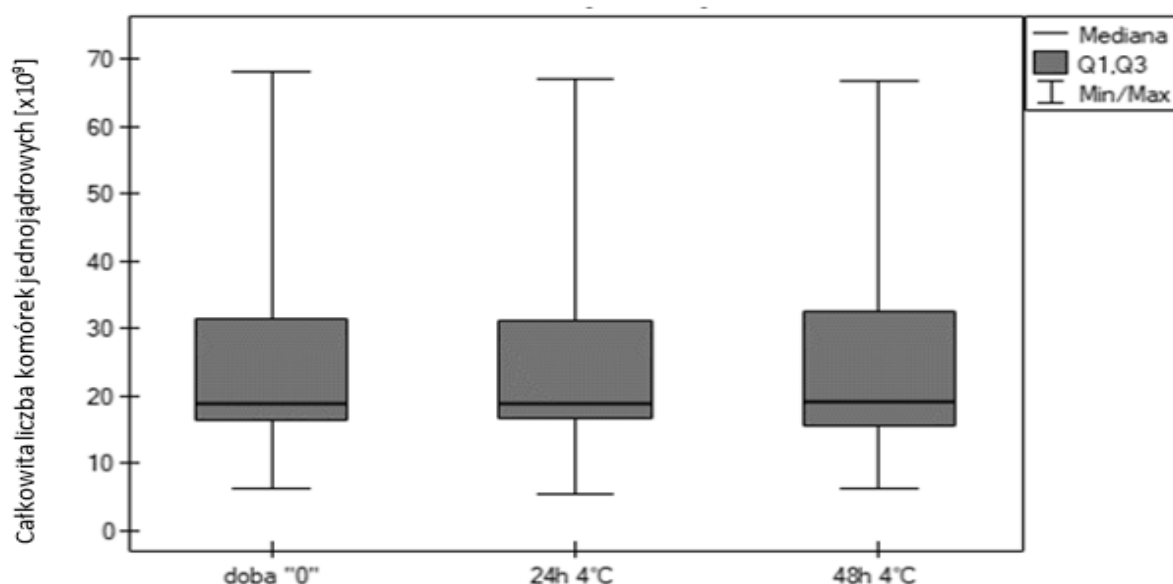
	Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4°C [x10 ⁹]				
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	18,75	25,29± 14,2	6,21	68,14	0,091774
24h	18,88	24,8± 13,74	5,43	67,13	
48h	19,15	24,61± 13,67	6,21	66,8	

Tabela 57. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 55 przedstawiono porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania w 4°C.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [x10 ⁹] doba „0”	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [x10 ⁹] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [x10 ⁹] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Całkowita liczba komórek jednojądrowych doba „0”		0,841093	0,09255
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [x10 ⁹] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,841093		0,841093
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [x10 ⁹] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,09255	0,841093	

Tabela 58. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 45. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.25 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 56 i na wykresie 46 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. Różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych ocenianych przy użyciu analizatora hematologicznego w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C nie były istotne statystycznie.

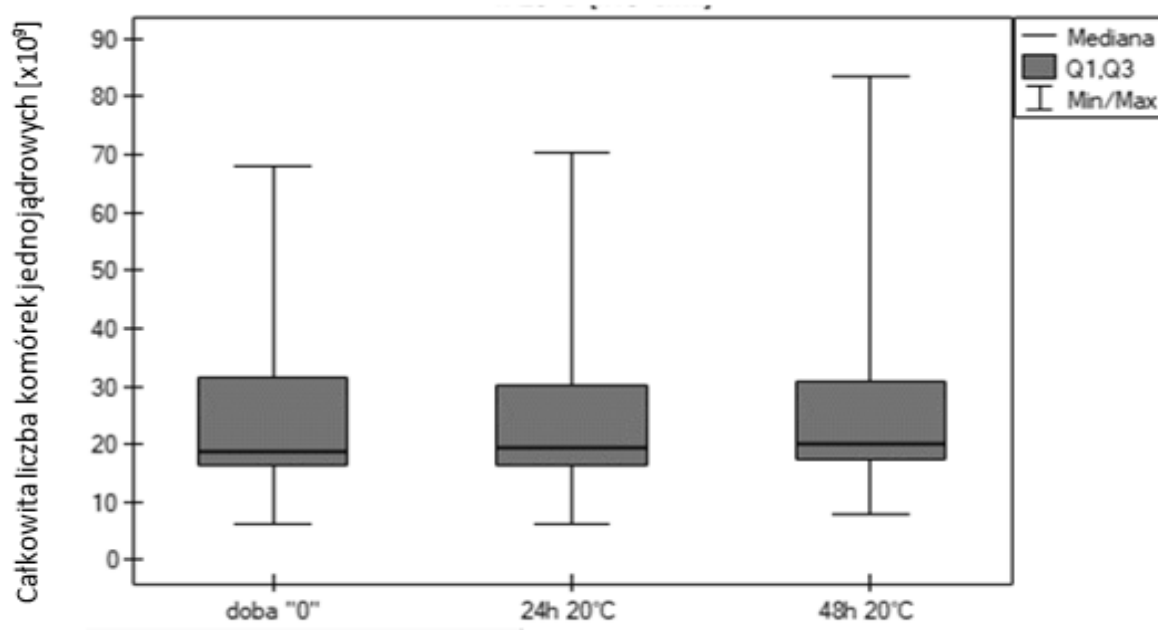
Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 20°C [$\times 10^9$]					
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	18,75	25,29 $\pm$ 14,2	6,21	68,14	0,078495
24h	19,38	24,56 13,64	6,3	70,47	
48h	20,11	26,06 16,06	7,91	83,5	

Tabela 59. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 57 przedstawiono porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w całkowitej liczbie komórek jednojądrowych między porównywanymi grupami.

Wartość p (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] doba „0”	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] doba „0”		0,487239	1
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,487239		0,078748
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	1	0,078748	

Tabela 60. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



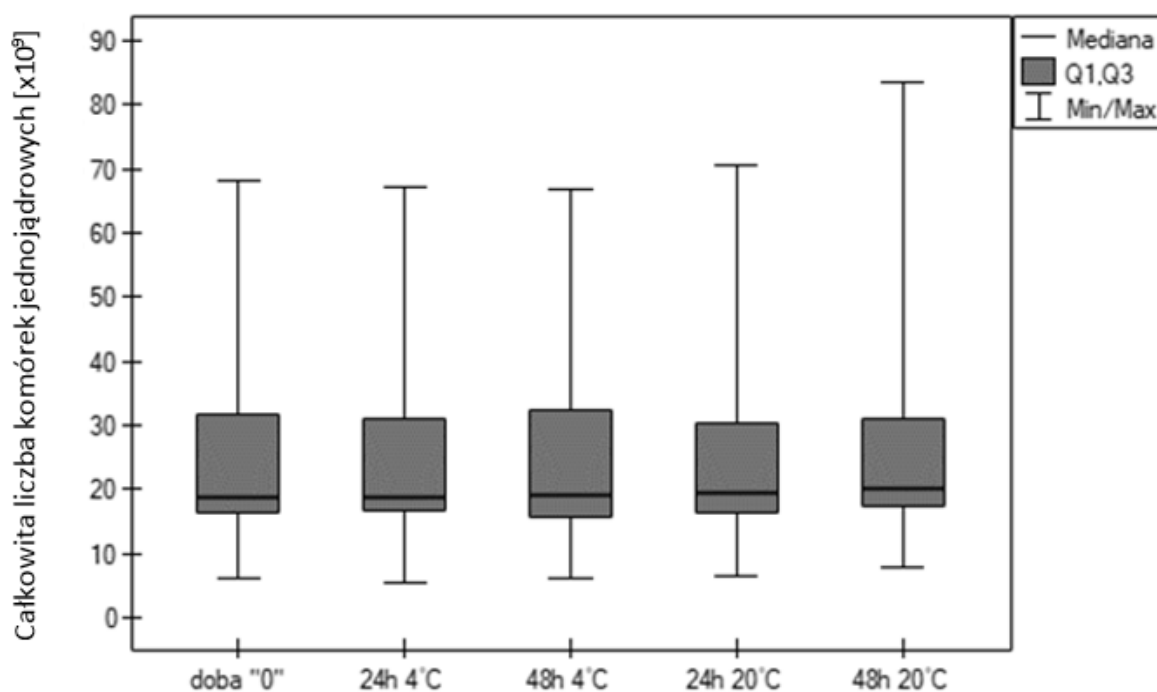
Wykres 46. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

4.3.26 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] w materiale przed zamrożeniem w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 58 i na wykresie 47 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Całkowita liczba komórek jednojądrowych wzrasta wraz z czasem przechowywania, jest wyższa w materiale przechowywanym w 20°C w porównaniu z materiałem przechowywanym w 4°C, różnice są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

	Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C i w 20 °C [$\times 10^9$]				
Przechowywanie w 4 °C i 20 °C	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	18,75	25,29 $\pm$ 14,2	6,21	68,14	0,025907
24h 4 °C	18,88	24,8 $\pm$ 13,74	5,43	67,13	
48h 4 °C	19,15	24,61 $\pm$ 13,67	6,21	66,8	
24h 20 °C	19,38	24,56 $\pm$ 13,64	6,3	70,47	
48h 20 °C	20,11	26,06 $\pm$ 16,06	7,91	83,5	

Tabela 61. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4 °C i 20 °C



Wykres 47. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4 °C i 20 °C

4.3.27 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C po 24h i 48h

W tabeli 59 i na wykresie 48 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych ocenianych w materiale po rozmrożeniu, przechowywanym przed zamrożeniem w temperaturze 4°C przez 24h i 48h, Wartości mediany całkowitej liczby komórek jednojądrowych wynosiły w materiale krioprezerwowanym w dobie „0” $19,84 \times 10^9$, po 24h przechowywania w 4°C $15,38 \times 10^9$ i po 48h przechowywania w 4°C $17,81 \times 10^9$.

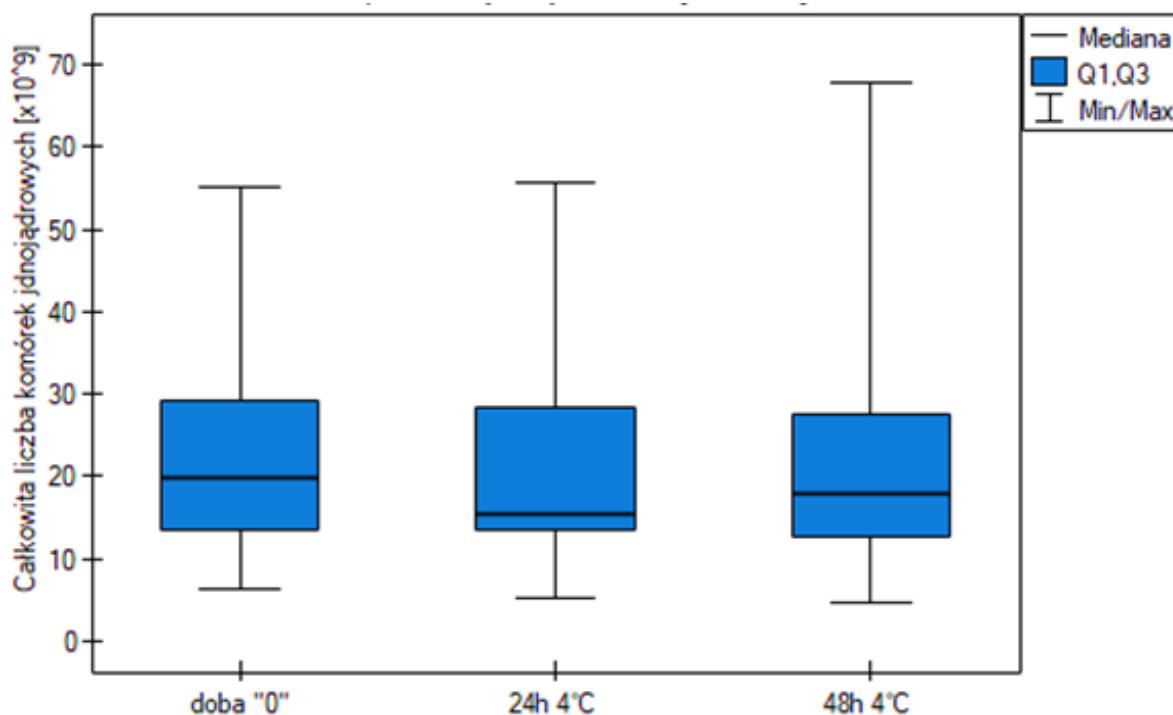
Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4°C [$\times 10^9$]					
Przechowywanie w 4°C	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	19,84	22,65 $\pm$ 12,44	6,39	55,13	0,006317
24h	15,38	20,98 $\pm$ 11,67	5,29	55,78	
48h	17,81	22,04 $\pm$ 13,78	4,65	67,83	

Tabela 62. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

W tabeli 60 przedstawiono Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych stwierdzono między materiałem ocenianym po rozmrożeniu, krioprezerwowanym w dobie „0” a materiałem przechowywanym w 4°C przez 24h przed krioprezerwacją.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] doba „0”	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 4°C
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$]doba „0”		0,226211	0,004495
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 4°C	0,226211		0,487239
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 4°C	0,004495	0,487239	

Tabela 63. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C



Wykres 48. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C

4.3.28 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 61 i na wykresie 49 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych ocenianych w materiale po rozmrożeniu, przechowywanym przed zamrożeniem w temperaturze 20°C przez 24h i 48h. Wartości mediany całkowitej liczby komórek jednojądrowych wynosiły w materiale krioprezerwowanym w dobie „0” $19,84 \times 10^9$, po 24h przechowywania w 4°C $16,85 \times 10^9$ i po 48h przechowywania w 4°C $17,47 \times 10^9$.

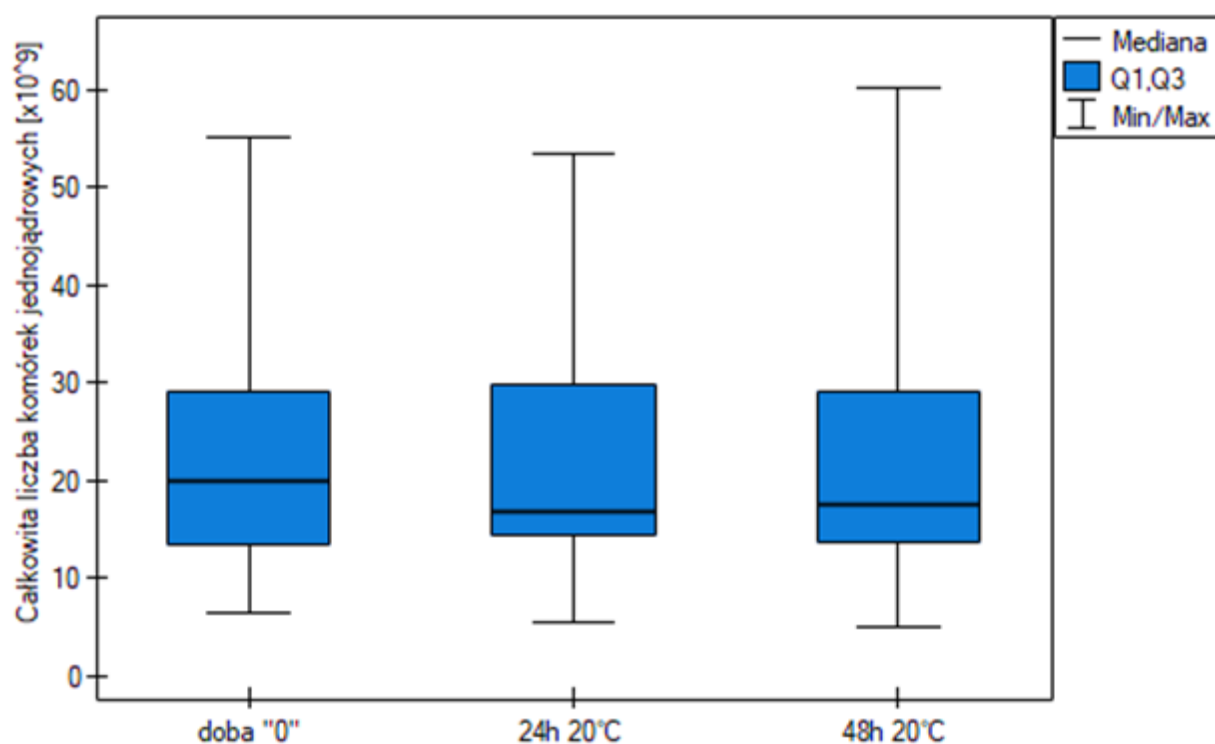
Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 20°C [$\times 10^9$]					
Przechowywanie w 20°C	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	19,84	22,65 $\pm$ 12,44	6,39	55,13	0,02627
24h	16,85	21,62 $\pm$ 11,71	5,57	53,44	
48h	17,47	21,74 $\pm$ 13,3	5,01	60,21	

Tabela 64 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

W tabeli 62 przedstawiono porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C (test POST-HOC Dunn Bonferroni). Istotne statystycznie różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych stwierdzono między materiałem ocenianym po rozmrożeniu, krioprezerwowanym w dobie „0” a materiałem przechowywanym w 20°C przez 24h przed krioprezerwacją.

Wartość p-value (test POST-HOC Dunn Bonferroni)			
Układ badania	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] doba „0”	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 20°C
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] doba „0”		0,759114	0,022959
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 24h w temp. 20°C	0,759114		0,382525
Całkowita liczba komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] czas przechowywania 48h w temp. 20°C	0,022959	0,382525	

Tabela 65. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C



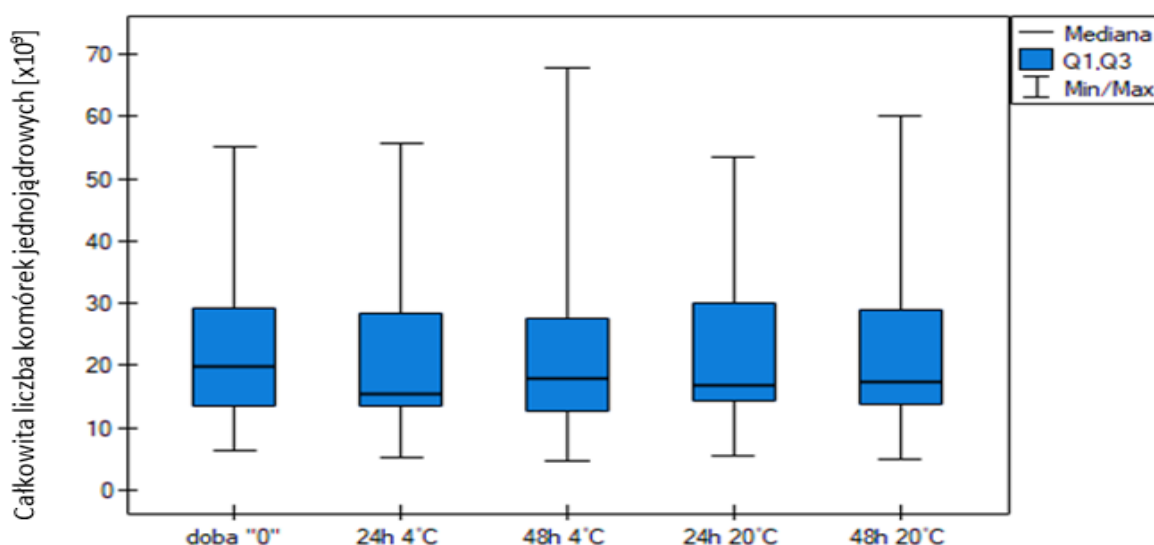
Wykres 49. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C

4.3.29 Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych [$\times 10^9$] po rozmrożeniu w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 63 i na wykresie 50 przedstawiono porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu krioprezerwowanym w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C.

Całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4 °C i w 20°C [$\times 10^9$]					
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	19,84	22,65 $\pm$ 12,44	6,39	55,13	0,007441
24h 4°C	15,38	20,98 $\pm$ 11,67	5,29	55,78	
48h 4°C	17,81	22,04 $\pm$ 13,78	4,65	67,83	
24h 20°C	16,85	21,62 $\pm$ 11,71	5,57	53,44	
48h 20°C	17,47	21,74 $\pm$ 13,3	5,01	60,21	

Tabela 66. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



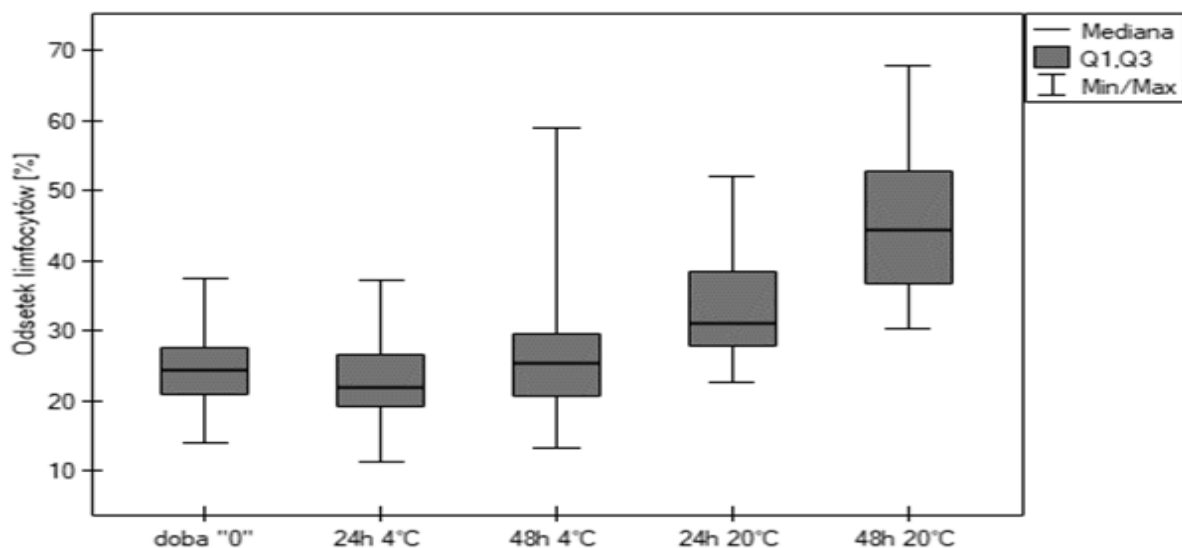
Wykres 50. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.30 Porównanie odsetka limfocytów [%] przed zamrożeniem w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 64 i na wykresie 51 przedstawiono porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem przy użyciu analizatora hematologicznego. Najwyższą wartość stwierdzono w materiale przechowywanym przez 48h w 20°C, natomiast najniższą w materiale po 24h przechowywania w 4°C.

	Odsetek limfocytów w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C i w 20°C [%]				
Przechowywanie w 4 °C i 20 °C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	24,4	24,8± 6,15	14	37,4	<0,000001
24h 4°C	21,8	22,89± 6,02	11,3	37,3	
48h 4°C	25,3	26,31± 9,08	13,2	59	
24h 20°C	31,1	33,64± 8,17	22,7	52,1	
48h 20°C	44,4	45,58± 10,56	30,2	67,8	

Tabela 67. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



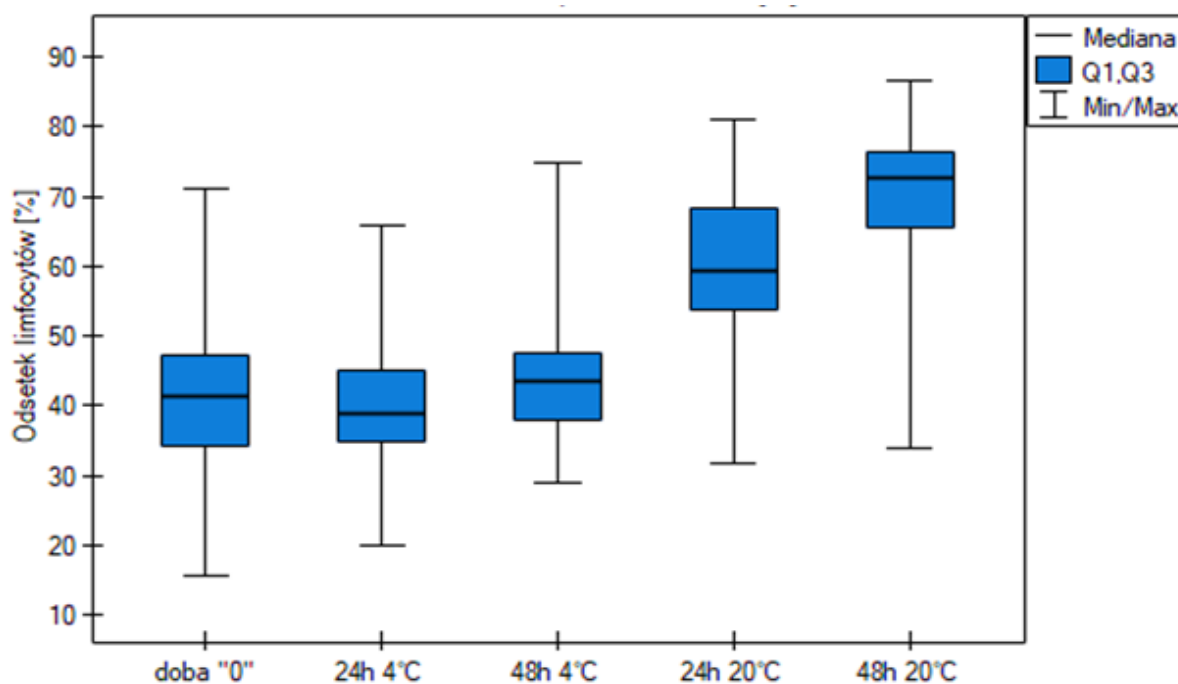
Wykres 51. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.31 Porównanie odsetka limfocytów [%] po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 65 i na wykresie 52 przedstawiono porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Odsetek limfocytów różnił się istotnie statystycznie w materiale ocenianym po rozmrożeniu poddanym krioprezerwacji w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Najwyższą wartość mediany odsetka stwierdzono po 48h przechowywania w 20°C a najniższą w materiale przechowywanym przez 24h w 4°C.

	Odsetek limfocytów po rozmrożeniu w materiale przechowywanym w 4°C i w 20°C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	41,2	41± 10,36	15,6	71,2	<0,000001
24h 4°C	38,8	39,7±5 9,6	19,8	65,9	
48h 4°C	43,5	44,4± 10,14	28,8	74,9	
24h 20°C	59,2	60,31± 12,4	31,6	80,9	
48h 20°C	72,6	70,51± 10,64	33,8	86,6	

Tabela 68. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 52. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

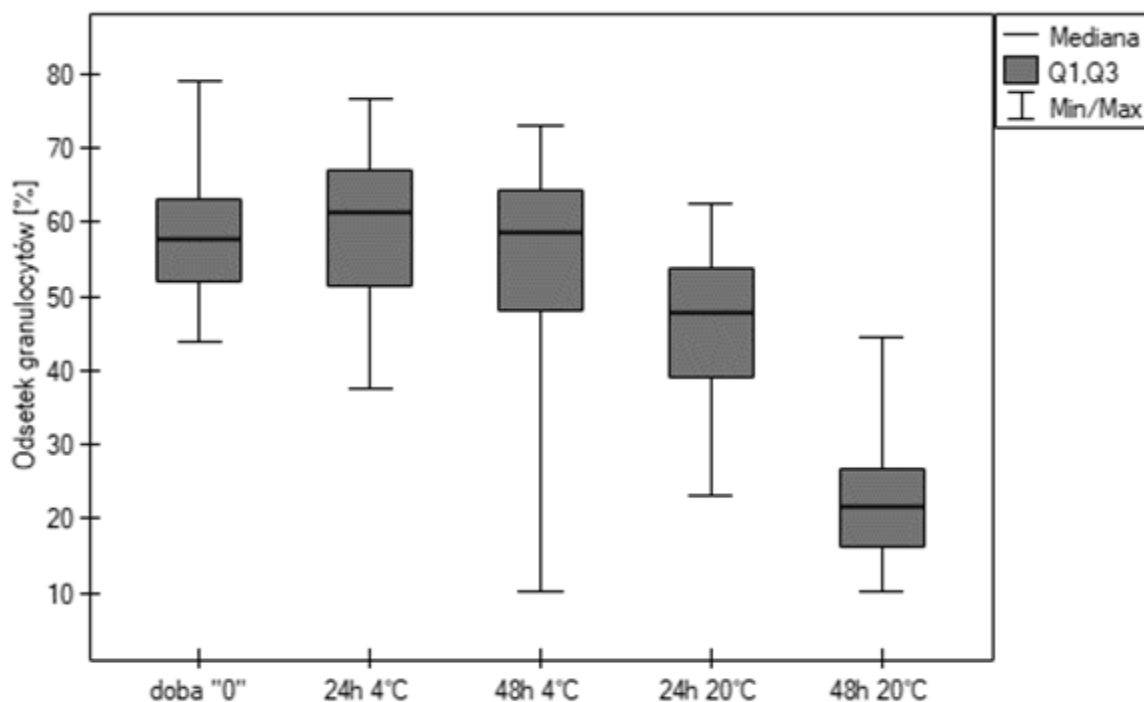
4.3.32 Porównanie odsetka granulocytów [%] przed zamrożeniem w materiale w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 66 i na wykresie 53 przedstawiono porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Stwierdzono istotne statystycznie różnice

odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem przy użyciu analizatora hematologicznego. Najwyższą wartość stwierdzono w materiale przechowywanym przez 24h w 4°C, natomiast najniższą w materiale po 48h przechowywania w 20°C.

	Odsetek granulocytów w materiale przed zamrożeniem przechowywanym w 4 °C i w 20 °C [%]				
Przechowywanie w 4 °C i 20 °C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	57,7	57,6± 8,9	43,8	79	<0,000001
24h 4°C	61,4	59,2± 10,24	37,5	76,7	
48h 4°C	58,7	55,58± 13,84	10,2	47,6	
24h 20°C	47,7	45,92± 9,88	23,1	62,6	
48h 20°C	21,7	23,35± 9,14	10,2	44,4	

Tabela 69. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



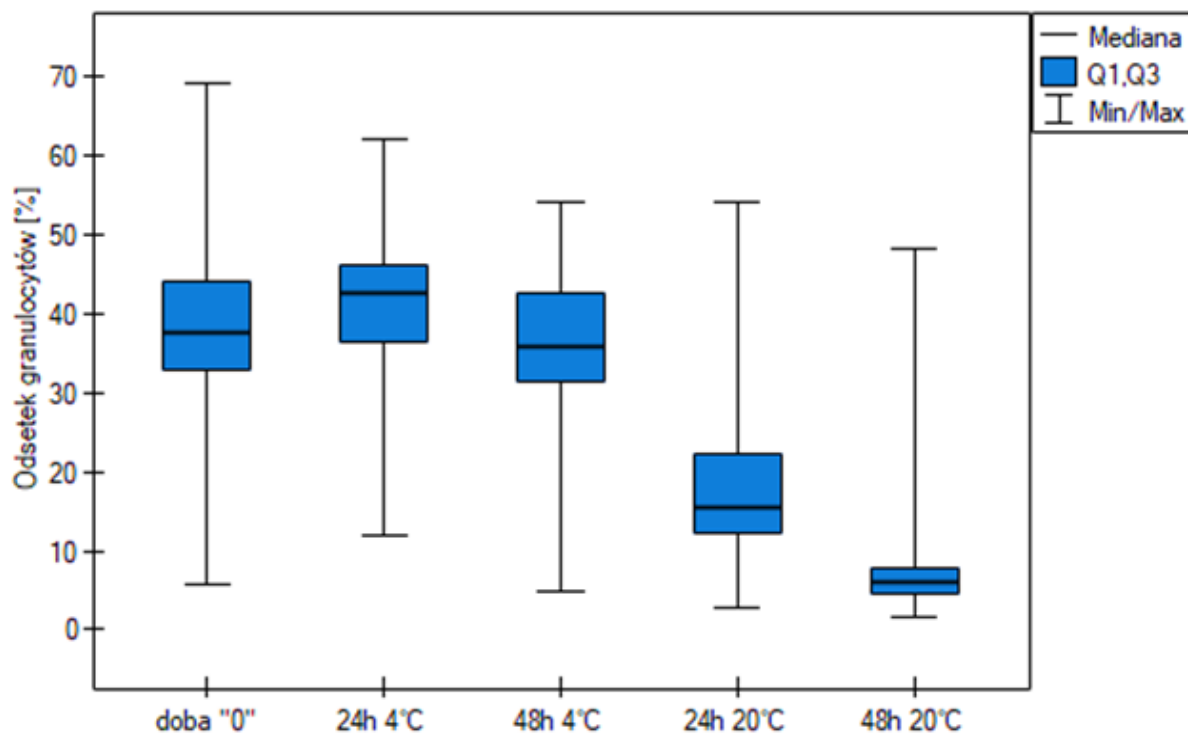
Wykres 53. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

4.3.33 Porównanie odsetka granulocytów [%] po rozmrożeniu w materiale zamrożonym w dobie „0” oraz przechowywanym w 4°C i w 20°C po 24h i 48h

W tabeli 67 i na wykresie 54 przedstawiono porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C. Odsetek granulocytów różnił się istotnie statystycznie w materiale ocenianym po rozmrożeniu poddanym krioprezerwacji w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C. Najwyższą wartość mediany odsetka stwierdzono po 24h przechowywania w 4°C, a najniższą w materiale przechowywanym przez 48h w 20°C ($p < 0,05$).

	Odsetek granulocytów w materiale po rozmrożeniu przechowywanym w 4 °C i w 20°C [%]				
Przechowywanie w 4°C i 20°C	Mediana	Średnia ± odchylenie standardowe	Minimum	Maksimum	test Anova Friedmana p-value
„0”	37,5	38,57± 11,29	5,7	69,2	<0,000001
24h 4°C	42,6	41,86± 10,67	11,9	62,6	
48h 4°C	35,8	35,3± 10,34	4,9	54,1	
24h 20°C	15,4	18,6± 11,57	2,9	54	
48h 20°C	6	7,92± 8,17	1,6	48,3	

Tabela 70. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C



Wykres 54. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

Zarówno czas jak i temperatura powodują znaczne obniżenie odsetka granulocytów. Zjawisko to jest bardziej widoczne w próbach przechowywanych w 20°C.

5. Dyskusja

Transplantacja komórek krwiotwórczych jest uznaną metodą leczenia wielu chorób hematologicznych oraz niehematologicznych. Obecnie komórki krwiotwórcze znalazły zastosowanie w leczeniu wielu innych chorób m.in. autoimmunologicznych. Z roku na rok liczba transplantacji rośnie. Wynika to z coraz większej liczby wskazań oraz stale przesuwającej się górnej granicy wieku.

W badaniach własnych skupiono się na wynikach uzyskanych w grupie chorych poddanych terapii mieloablacyjnej oraz transplantacji auto-KK. Podobnie jak w piśmiennictwie światowym, byli to chorzy z zaburzeniami układu limfoidalnego. Taką procedurę najczęściej przeprowadza się obecnie w przypadku chorych na szpiczaka plazmocytowego, chłoniaka Hodgkina oraz chłoniaka nieziarniczego [79]. W przypadku transplantacji autologicznych komórek krwiotwórczych procedura kolekcji KK oraz ich przeszczepienia są oddalone w czasie. W związku z tym konieczne jest przeprowadzenie procedury krioprezerwacji celem zabezpieczenia materiału transplantacyjnego do momentu przeszczepienia. Takie postępowanie zastosowano i analizowano w badaniach własnych. Transplantacje autologicznych komórek krwiotwórczych cechuje stosunkowo niska śmiertelność. Efekt przeciwnowotworowy w tej sytuacji zależy wyłącznie od zastosowanej chemioterapii bądź radioterapii [14, 80].

W latach 80 XX wieku do transplantacji zaczęto stosować komórki krwiotwórcze pochodzące z mobilizowanej krwi obwodowej, która obecnie jest najczęstszym źródłem KK. W badaniach własnych również wykorzystywano komórki krwiotwórcze pochodzące z mobilizowanej krwi obwodowej. Komórki krwiotwórcze z mobilizowanej krwi obwodowej są pozyskiwane przy użyciu separatora komórkowego. Procedura pozyskania KK z mobilizowanej krwi obwodowej jest stosunkowo mało inwazyjna i w przeciwieństwie do KK pozyskanych ze szpiku kostnego nie wymaga znieczulenia ogólnego. Do niewątpliwych zalet tego typu komórek należy szybsza rekonstrukcja w porównaniu z przeszczepieniem KK ze szpiku kostnego, co skraca czas hospitalizacji, ryzyko wystąpienia powikłań infekcyjnych, a tym samym koszty przeprowadzenia procedury. Niestety w przypadku transplantacji KK z mobilizowanej krwi obwodowej ryzyko wystąpienia ostrej a zwłaszcza przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi jest zdecydowanie większe niż w przypadku przeszczepienia KK ze szpiku kostnego [81].

Aferza może przebiegać przy użyciu technologii filtracji membranowej bądź poprzez zastosowanie siły odśrodkowej i wykorzystanie różnic gęstości [33]. Pierwszym etapem pozyskania komórek przy użyciu metody leukaferazy jest mobilizacja. Dzięki mobilizacji możliwe jest przemieszczenie komórek krwiotwórczych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Najczęściej stosowanym środkiem służącym do mobilizacji jest czynnik wzrostu G-CSF. Indukuje on zmiany funkcjonalne w mikrośrodku szpiku, dochodzi do uwolnienia enzymów z komórek pochodzących z linii mieloidalnej, które upośledzają interakcję między chemokinami i ich receptorami co umożliwia uwolnienie komórek krwiotwórczych do krwioobiegu. Oprócz G-CSF do mobilizacji można zastosować preliksafor, który jest odwracalnym antagonistą receptora chemokinowego.

Oprócz pobrania komórek krwiotwórczych przy użyciu aferzy możemy pozyskać krwinki czerwone, płytki krwi bądź osocze, a także przeprowadzić procedurę leczniczej wymiany osocza. W badaniach własnych osocze uzyskiwane podczas leukaferazy komórek krwiotwórczych wykorzystywano jako składnik mieszaniny krioprezerwacyjnej i istotne źródło białek niezbędnych do ochrony zamrażanych KK.

W badaniach własnych i zgodnie z piśmiennictwem, leukaferzę przeprowadzano po uprzednim podaniu pacjentowi czynnika wzrostu w skojarzeniu z chemioterapią. Skuteczną leukaferzę można przeprowadzić przy uzyskaniu wartości >20 komórek $CD34^{+}/\mu L$. Klein G. i wsp. podaje, iż w przypadku liczby komórek mieszczącej się w zakresie 10-20 kom. $CD34^{+}/\mu L$ konieczne jest indywidualne podejście do pacjenta i decyzję o rozpoczęciu aferzy podejmuje się w zależności od stopnia zaawansowania choroby i możliwości dalszego leczenia [18]. Natomiast Kriegsmann i wsp. w sytuacji liczby komórek mieszczącej się w zakresie 10-20 $CD34^{+}/\mu L$ wskazuje na konieczność zastosowania preliksaforu [82]. Obecnie, w sytuacji szeroko rozwiniętego dawstwa komórek krwiotwórczych na całym świecie dużą wagę przywiązuje się do bezpieczeństwa całej procedury pobrania. Bardzo ważne jest, aby zarówno dawcy jak i pacjenci poddawani leukaferzie byli dokładnie poinformowani o przebiegu procesu oraz możliwych działaniach niepożądanych. Takie postępowanie stosuje się w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Poznaniu. Cała procedura zawarta jest w dokumentach SZJ oddziału. Jak wynika z literatury najczęściej spotykanymi efektami ubocznymi stosowania terapii mobilizującej są bóle kości, bóle głowy oraz uczucie ogólnego osłabienia [33].

U zdrowych dawców stosowano wyłącznie czynnik wzrostu i procedurę pobrania komórek przeprowadzano zawsze piątego dnia od rozpoczęcia przyjmowania czynnika wzrostu. Takie postępowanie jest zgodne z literaturą i wynika z wieloletniej praktyki klinicznej [17]. Taką procedurę stosowano również przy pozyskaniu materiału w Klinice.

Na końcowy efekt procedury pozyskania komórek krwiotwórczych ma wpływ wiele czynników. Jednym z nich jest wiek pacjenta. W badaniach własnych średnia wieku pacjentów w zakresie porównania aferez uzyskanych przy użyciu różnych separatorów wynosiła 42 lata. U osób młodych występuje wysoki potencjał do samoodnawiania oraz niski odsetek komórek patologicznych. Wraz z wiekiem dochodzi do upośledzenia procesu autofagii, zwiększa się również liczba mutacji, telomery ulegają skróceniu. Uważa się, iż defekty genetyczne ulegają akumulacji w komórkach, powodując późniejsze zmiany w procesie hematopoezy, uwidaczniające się wraz ze starzeniem organizmu. Wraz z wiekiem wzrasta również produkcja reaktywnych form tlenu. W efekcie prowadzi to do mniej wydajnych kolekcji komórek krwiotwórczych [25, 83]. W badaniach własnych nie stwierdzono zależności między wiekiem pacjenta bądź dawcy a wydajnością zbiórki.

Płeć pacjenta bądź dawcy jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na procedurę leukaferozy. W badaniach własnych porównano grupę 125 kobiet i 167 mężczyzn. Wydajność aferezy, czyli całkowita liczba komórek CD34+, w badaniach własnych, w przypadku obu zastosowanych separatorów, była wyższa u mężczyzn. Podobnie zaobserwował Kresnik i wsp., którzy tłumaczyli tę sytuację wyższym stężeniem testosteronu u mężczyzn. [28] Lenk i wsp. również zauważyli mniejszą wydajność aferezy u kobiet. Podejrzewa się również, że korzystny wpływ na wydajność zbiórki mają estrogeny, dlatego lepszy efekt uzyskuje się u kobiet w wieku rozrodczym niż u kobiet w okresie menopauzy [84].

Głównym celem leukaferozy jest pozyskanie jak największej liczby komórek krwiotwórczych w możliwie krótkim czasie. W przypadku zastosowania separatora Spectra Optia jest możliwość przeprowadzenia procedury w systemie ciągłym - CMNC. Jednakże zbyt duża objętość pobranego materiału może powodować niedociśnienie i tachykardię u pacjenta. Problemem może być także duża objętość zastosowanego w czasie leukaferozy antykoagulantu, co może doprowadzić do hipokalcemii, zasadowicy metabolicznej, hipokaliemii i hipomagnezemii u dawcy bądź pacjenta [35]. Ze względu

na niepożądane reakcje, w poznańskim ośrodku, zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami nadzór nad procesem separacji zawsze sprawuje przeszkolony personel medyczny.

W latach ubiegłych bardzo często stosowanym separatorem komórkowym był Cobe Spectra, który jest systemem w dużej części zależnym od operatora. Jego działanie opiera się na manualnej regulacji interfejsu, jest urządzeniem półautomatycznym i nie posiada czujnika optycznego. Natomiast Spectra Optia jest nowszym separatorem komórkowym i ma możliwość ciągłego poboru z automatycznym ustawieniem interfejsu [32,85]. W badaniach własnych dokonano porównania separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia w zakresie uzyskanych parametrów na podstawie aferez przeprowadzonych w 2015 roku. W 168 przypadkach zastosowano separator Cobe Spectra, natomiast 124 leukaferazy przeprowadzono na separatorze Spectra Optia. Obecnie separator komórkowy Cobe Spectra jest wycofany z obrotu. Posiadanie przez poznański oddział separatorów różnych typów w tym czasie pozwoliło na porównanie szeregu parametrów uzyskiwanych przy użyciu obu tych urządzeń. Wydaje się to cenne zarówno ze względów poznawczych jak i praktycznych.

Ważnym parametrem mającym duże znaczenie dla dalszej preparatyki i jakości materiału transplantacyjnego ma objętość pozyskanego preparatu. W badaniach własnych istotnie statystycznie wyższą wartość objętości uzyskano przy zastosowaniu separatora Spectra Optia. Mediana wartości objętości preparatów uzyskanych na separatorze Spectra Optia wynosiła 182 ml, natomiast na separatorze Cobe Spectra 76 ml. Podobny rezultat uzyskali Yanchun Li i wsp.. Natomiast Se-Na i wsp. zaobserwowali podobną objętość w przypadku obu separatorów [31, 32]. Dhawan Setia i wsp. porównali natomiast parametry produktów uzyskanych przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Amicus. Większą objętość uzyskali przy zastosowaniu separatora Cobe Spectra [86]. Różnice w objętościach zastosowanych separatorów mogły wynikać z ustawień separatorów, umiejętności operatora i jego doświadczenia, a także właściwości osobniczych dawcy bądź pacjenta.

Oprócz objętości materiału separacyjnego kolejnym ważnym aspektem w przypadku leukaferazy była liczba komórek jednojądrowych. W badaniach własnych istotnie statystycznie większą liczbę komórek jądrowych uzyskano w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia. Mediana wartości całkowitej liczby komórek jednojądrowych uzyskanych z zastosowaniem separatora Spectra Optia wynosiła $33,52 \times 10^9$, natomiast $16,98 \times 10^9$ w przypadku użycia separatora Cobe Spectra. Se-Na Lee

i wsp. również w swoich badaniach zaobserwowali większą liczbę komórek jednojądrowych w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia aniżeli Cobe Spectra [31]. Natomiast Lopez-Pereira i wsp. zaobserwowali większą całkowitą liczbę komórek jednojądrowych w przypadku zastosowania separatora Cobe Spectra w porównaniu do Spectra Optia [89]. Wysoka liczba komórek jednojądrowych przy małej objętości przekłada się na wysokie ich stężenie w materiale, co niesie za sobą wiele niekorzystnych efektów m.in. powoduje zmniejszenie żywotności komórek CD34+. Oprócz bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych istotny jest również ich rodzaj. Duża zawartość dojrzałych granulocytów w produkcie może generować proces „clumpingu” czyli samoistnej agregacji komórek po rozmrożeniu. Niektóre ośrodki stosują procedurę rutynowego dodawania dodatkowej porcji osocza autologicznego do produktu, aby zapewnić lepsze środowisko komórkom i zagwarantować wysoką jakość materiału transplantacyjnego [87]. Dodatkowo, produkt zawierający wysoką liczbę granulocytów, które po rozmrożeniu ulegają rozpadowi, podczas infuzji może powodować wystąpienie gorączki u pacjenta, dreszcze, świąd a także wysypkę [56,89]. Oprócz dojrzałych granulocytów w materiale mogą być obecne monocyty, które mają aktywność prokoagulacyjną z racji wydzielania przez nie czynnika tkankowego, co w konsekwencji powoduje krzepnięcie materiału po rozmrożeniu [51].

W trakcie leukaferazy mogą wystąpić reakcje niepożądane, opóźniające zbiórkę. Jednym z nich jest zjawisko zlepienia się płytek. Może do niego dojść z różnych przyczyn. Są nimi: choroba podstawowa, schemat mobilizacji oraz kontakt krwi ze sztuczną powierzchnią. Proces spontanicznego zlepienia się płytek jest bardzo niebezpieczny, gdyż często przebiega lawinowo prowadząc do utraty znacznej części materiału transplantacyjnego. W sytuacji zlepienia płytek osoba przeprowadzająca aferezę może dodać dodatkową ilość antykoagulantu, aby zatrzymać proces. Niestety takie postępowanie może przyczynić się do niepożądanej reakcji u pacjenta związanej z toksycznością środka przeciwkrzepliwego [87]. Dodatkowe zjawiska towarzyszące procedurom leukaferazy i utrudniające jej przebieg to m.in.: problem z dostępem żylnym czy niemożność ustawienia interfejsu. Dlatego tak ważne jest, aby procedurę leukaferazy przeprowadzał przeszkolony i doświadczony personel. Z własnych obserwacji wynika, iż zlepienie się płytek krwi było znacznie bardziej nasilone w przypadku separatora Spectra Optia niż Cobe Spectra. Sytuacja ta prawdopodobnie wynikała z wyższej siły odśrodkowej i mniejszych porów filtra w przypadku separatora Spectra Optia [88]. Wysoka zawartość płytek krwi w preparacie wiąże się z większą utratą płytek u pacjenta

i może prowadzić do cytopenii, szczególnie w przypadku aferezy przeprowadzanej u pacjentów. W badaniach Deneys i wsp. mniejsze zanieczyszczenie płytkami krwi stwierdzono w przypadku zastosowania separatora Amicus w porównaniu z ComTec i Cobe Spectra [89]. W badaniach prowadzonych przez Lopez-Pereira i wsp. większą utratę płytek krwi u pacjentów stwierdzono w przypadku leukaferez przeprowadzonych na separatorze Cobe Spectra niż Spectra Optia [89].

Najważniejszym parametrem decydującym o późniejszej rekonstytucji u pacjenta jest bezwzględna liczba komórek CD34+. W badaniach własnych zdecydowanie lepsze rezultaty aferezy uzyskano przy użyciu separatora Spectra Optia niż Cobe Spectra. Mediana wartości całkowitej liczby komórek CD34+ w preparatach uzyskanych na separatorze Spectra Optia wynosiła $243,82 \times 10^6$, natomiast przy użyciu separatora Cobe Spectra $143,32 \times 10^6$. Yanchun i wsp. oraz Lopez-Pereira i wsp. uzyskali podobne wyniki. W celu poprawienia parametrów zbiórki wprowadzono dodatkowy program kolekcji w separatorze Spectra Optia - CMNC, który polega na ciągłym poborze, jest łatwiejszy w obsłudze i mniej czasochłonny. Pandey i wsp. porównali wydajność zbiórki systemem CMNC na separatorze Spectra Optia oraz Cobe Spectra. Lepszą wydajność uzyskali używając separatora Spectra Optia. Wysoka wydajność jest jednym z najważniejszych parametrów zbiórki, minimalizuje koszty związane z powtórnią kolekcją, nie naraża również pacjenta bądź dawcy na konieczność ponownego przyjęcia czynnika wzrostu [32, 89, 90].

Czas trwania aferezy jest różny i zależy od wielu czynników. Zgodnie z naszą praktyką kliniczną procedury trwają zazwyczaj 4-5 godzin. Przed przystąpieniem do procedury lekarz prowadzący pacjenta ocenia dostęp żylny i ewentualną konieczność założenia wkłucia centralnego. Przeprowadzanie leukaferazy w przypadku słabego przepływu krwi znacznie wydłuża kolekcję. Długość trwania procedury nie powinna przekraczać 5 godzin, a liczba leukaferaz prowadzonych w kolejnych dniach nie powinna być większa niż 4, przyjmując, że 1 kolekcja wykonywana jest w jednym dniu. Z piśmiennictwa wynika, iż kolekcje prowadzone w kolejnych dniach, powyżej 4, są nieefektywne [18]. W analizie Yanchun Li i wsp. afereza trwała dłużej na separatorze Spectra Optia. Podobne wyniki uzyskali Maïtta oraz Se-Na Lee i wsp. [31,32, 33]. Zbyt długi czas trwania aferezy nie jest korzystny, gdyż z czasem wydajność kolekcji znacznie spada. Jednakże często wydłużenie aferezy pozwala na uniknięcie kolejnego dnia aferezy, co znacznie zmniejsza koszty całej procedury. W takiej sytuacji niezbędne jest indywidualne podejście do pacjenta. Jeżeli liczba leukocytów we krwi obwodowej w dniu

aferezy jest wysoka podanie kolejnego czynnika wzrostu jest ryzykowne. Wtedy wskazane byłoby kontynuowanie aferezy. Na podstawie naszej praktyki klinicznej zdarzają się również sytuacje, które zmuszają do przerywania aferezy. Są to przede wszystkim wskazania medyczne. Złe samopoczucie dawcy, omdlenie czy objawy związane z toksycznością ACD-A wprowadzanego podczas leukaferozy do krwioobiegu pacjenta [87].

W badaniach własnych przeanalizowano żywotność komórek w zależności od zastosowanego separatora komórkowego. Wartość mediany żywotności komórek CD34+ ocenianych przed zamrożeniem wynosiła w przypadku użycia separatora Spectra Optia 100%, natomiast przy użyciu separatora Cobe Spectra 99,9%. Pandey oraz Lopez-Pereira w swoich badaniach również nie stwierdzili istotnych różnic w żywotności komórek ocenianych przed zamrożeniem. [85, 90] Mediana żywotności komórek jednojądrowych, w skład których wchodzi również komórki CD34+, po rozmrożeniu w badaniach własnych wynosiła 85% w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia, oraz 88% w przypadku zastosowania separatora Cobe Spectra. Natomiast mediana żywotności wyłącznie komórek CD34+ w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia wynosiła 97,79%, natomiast przy użyciu separatora Cobe Spectra 96,9%. Różnice te są niewielkie i pozwalają na bezpieczne przeprowadzenie procedury transplantacyjnej przy użyciu obu separatorów.

Transplantacja allogenicznych komórek krwiotwórczych jest jedynym rodzajem transplantacji pozwalającym na przeprowadzenie procedury pomimo niezgodności grupowej krwi między dawcą a biorcą. Jest to około 20-40% wszystkich przeszczepień allogenicznych komórek krwiotwórczych. Niestety w sytuacji transplantacji z niezgodnością może dojść do późniejszych poważnych konsekwencji. Są to m.in. hemoliza, opóźniona rekonstrukcja układu czerwonych, czy choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Aby zminimalizować skutki przeszczepienia niezgodnego grupowo materiału konieczne jest przeprowadzenie preparatyki w banku komórek. Objętość krwinek czerwonych przetoczonych pacjentowi z niezgodnością dużą nie powinna przekraczać 20 ml, dlatego ważne jest, aby produkt leukaferozy był w jak najmniejszym stopniu zanieczyszczony erytrocytami [37]. Obecnie pozyskiwane preparaty zazwyczaj zawierają bezpieczną ilość krwinek czerwonych i nie wymagają ich usuwania. Se-Na Lee i wsp., Yanchun Li i wsp. a także Lopez-Pereira i wsp. zauważyli niższy hematokryt w przypadku zastosowania separatora Spectra Optia [31, 32, 85]. W przypadku transplantacji komórek krwiotwórczych z niezgodnością dużą

izoaglutyniny biorcy reagują z antygenami obecnymi na erytrocytach dawcy powodując opóźnienie rekonstytucji. Zgodność grupowa między dawcą i biorcą niesie za sobą najmniejsze ryzyko powikłań. Natomiast w przypadku niezgodności należy jak najbardziej oczyścić produkt, aby zminimalizować reakcje niepożądane, takie jak GVHD czy hemolizę, wynikające z przetoczenia niezgodnej grupowo krwi [91]. Redukcja erytrocytów powinna przebiegać zgodnie z przyjętymi dokumentami SZJ i powinna być prowadzona przez doświadczony personel banku. Procedura wiąże się bowiem z utratą komórek CD34+. Preparatyka tego typu może być prowadzona również przy użyciu separatorów. W badaniach własnych redukcję prowadzono zgodnie z przyjętymi schematami postępowania SZJ bez wykorzystywania separatora.

Po przeprowadzonej leukaferizie materiał jest dostarczany do banku komórek, celem dalszej preparatyki. Praca w BKM jest wykonywana w pomieszczeniach zaopatrzonych w filtry HEPA, o podwyższonym reżimie sanitarnym. Wszyscy pracownicy banku przed przystąpieniem do czynności preparatywnych zmieniają obuwie, zakładają jałowy czepek, maseczkę i fartuch barierowy. Zgodnie z przepisami praca w BK nie posiadającym klasy czystości „A” musi odbywać się w systemie zamkniętym przy użyciu zgrzewarki do jałowego łączenia drenów. Takie zasady obowiązują w BKM.

Utrzymanie czystości w pomieszczeniach banku komórek i ich kontrola jest niezwykle istotna z mikrobiologicznego punktu widzenia. Drobnoustroje znajdujące się w powietrzu czy komorze laminarnej mogą doprowadzić do zanieczyszczenia przetwarzanego w pracowni produktu. Kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza pozwala na analizę trendu, identyfikację pojawiających się zanieczyszczeń oraz poczynienie odpowiednich kroków celem ich eliminacji. Szybkie wykrycie zanieczyszczenia w produkcji umożliwia również szybką reakcję lekarza i zastosowanie odpowiedniego leczenia u pacjenta [92]. W BKM czystość mikrobiologiczna powietrza jest kontrolowana każdorazowo w czasie pracy, metodą sedymentacyjną. Dodatkowo czystość mikrobiologiczna w newralgicznych punktach pomieszczenia preparatyki jest sprawdzana raz w miesiącu, po przeprowadzeniu gruntownego sprzątnięcia pomieszczeń banku.

Po przyjęciu materiału do banku komórek następuje jego ocena wzrokowa, analiza szczelności drenów oraz jednorodności zawiesiny. Następnie preparat jest znakowany zgodnie z obowiązującym systemem ISBT. Każdy preparat otrzymuje numer

SEC czyli jednolity kod europejski, który jest niepowtarzalny i zawiera informację jakie czynności preparatywne dotyczą tego produktu. Po wstępnej ocenie i oznakowaniu materiału najpierw oceniana jest jego objętość, a następnie czystość mikrobiologiczna. Ważne jest, aby kontrola mikrobiologiczna preparatu odbywała się przed rozpoczęciem czynności preparatywnych oraz po ich zakończeniu. Dzięki temu w razie wystąpienia zanieczyszczenia mikrobiologicznego możliwe jest prześledzenie poszczególnych etapów prac i uchwycenie momentu kontaminacji.

Po przeprowadzeniu tych czynności, przy użyciu analizatora hematologicznego, sprawdzana jest liczba komórek jednojądrowych. Kolejnym krokiem jest analiza odsetka komórek CD34+ oraz ich żywotności oceniana przy użyciu cytometru przepływowego z 7-AAD. W badaniach własnych analiza składu odsetkowego komórek CD34+ oraz ich żywotności oceniana jest w dwukrotnym powtórzeniu dla uniknięcia błędu laboratoryjnego. Wyniki badań poddawane są zewnątrz- i wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości. Cytometria przepływowa jest bardzo przydatną techniką pozwalającą na ocenę składu komórkowego materiału na podstawie cech morfologicznych komórek w nim zawartych - wielkości i ziarnistości. Badanie opiera się na wykrywaniu komórek posiadających na swojej powierzchni odpowiednie antygeny, które podczas analizy ulegają sprzęganiu z przeciwciałami związanymi z fluorochromami. Metoda ta jest obiektywna, szybka, pozwala na analizę wielu komórek jednocześnie. Do wad metody możemy zaliczyć stosunkowo wysoki koszt [42]. Ograniczeniem w ocenie żywotności komórek CD34+ jest fakt, iż nie jest w stanie wykryć komórek będących we wczesnej fazie apoptozy [67].

W badaniach własnych poza oceną żywotności komórek CD34+ techniką cytometrii przepływowej wykorzystywana jest starsza metoda mikroskopowa z użyciem błękitu trypanu, Tym razem oceniana jest żywotność komórek jednojądrowych w skład których wchodzi również komórki CD34 pozytywne. Informacje uzyskane przy pomocy tych dwóch metod uzupełniają się i stanowią poszerzenie wiedzy na temat komórek zawartych w materiale uzyskanym w wyniku aferezy. Metoda ta polega na ocenie mikroskopowej, przy użyciu mikroskopu świetlnego, próby inkubowanej wcześniej z błękitem trypanu. Po określonym czasie inkubacji barwnik wnika do wnętrza komórek martwych, zabarwiając je na niebiesko. Żywe komórki, bez defektu błony komórkowej, pozostają nienaruszone i nie ulegają zabarwieniu. Jest to metoda szybka i prosta w wykonaniu. Jednakże w ocenie żywotności z błękitem trypanu istnieje duże ryzyko wystąpienia artefaktów fałszujących wynik. Trzeba również pamiętać, iż metoda ta

ocenia całą populację komórek jednojądrowych, a nie jak to jest w przypadku cytometrii przepływowej tylko komórek CD34+. Jest to analiza subiektywna, ocenie podlega materiał biologiczny, dlatego wynik zależy w dużej mierze od doświadczenia oceniającego. Preparat powinien być oceniany niezwłocznie po nałożeniu na komorę. Zbyt długi czas inkubacji może zafałszować wynik [69].

Trzecią metodą, wykorzystywaną w obecnej praktyce znacznie rzadziej jest ocena potencjału klonogenego komórek krwiotwórczych, w badaniach własnych CFU-GM, przy użyciu hodowli *in vitro*. Metoda ta ma największą wartość w ocenie jakości, gdyż jako jedyna pozwala na analizę funkcjonalną przeszczepu. Próbkę KK po odpowiedniej izolacji umieszcza się na płytce hodowlanej w odpowiednim medium i poddaje inkubacji w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ przez 7-10 dni. Po tym czasie zlicza się liczbę utworzonych kolonii granulocytarno-monocytowych przy pomocy mikroskopu odwróconego. Do niewątpliwych wad metody możemy zaliczyć długi czas wykonania oraz oczekiwania na wynik a także subiektywność oceny. W poznańskim ośrodku ocenę potencjału klonogenego stosuje się od wielu lat. Jest to bardzo przydatna metoda szczególnie w kwestiach spornych, gdy żywotność komórek jednojądrowych oraz CD34+ jest poniżej 50%. Wtedy zgodnie z obowiązującymi w ośrodku własnymi procedurami ocenia się potencjał klonogeny prekursorów granulocytarno-monocytowych i na podstawie otrzymanych wyników zespół transplantacyjny podejmuje decyzję o kwalifikacji materiału do przeprowadzenia procedury przeszczepienia komórek krwiotwórczych. W wielu ośrodkach metoda ta nie jest stosowana ze względu na żmudność wykonania, brak walidacji oraz długi okres oczekiwania na wynik [74]. W badaniach własnych stosowano ocenę jakościową komórek z zastosowaniem wszystkich trzech metod.

Jeśli po pozyskaniu materiału transplantacyjny ma być podany pacjentowi lub poddany krioprezerwacji może być krótkoterminowo przechowywany w stanie ciekłym. Standardy mówiące o warunkach krótkoterminowego przechowywania materiału transplantacyjnego w dużej mierze zależą od doświadczeń własnych ośrodka. Jednakże zazwyczaj mówi się o przechowywaniu KK w temperaturze 2-8°C przez maksymalnie 72 godziny. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi JACIE, czyli oficjalnej europejskiej jednostki akredytującej ośrodki zajmujące się leczeniem chorób hematologicznych, warunki i okres przechowywania KK powinny być ściśle określone w Standardowych Procedurach Operacyjnych danego ośrodka i poddawane regularnej

walidacji. W podręczniku wydanym przez EBMT w 2019 roku maksymalny czas przechowywania wynosi 72 godziny w temperaturze 2-6°C [55, 37].

W ośrodku własnym szpik może być przechowywany przez maksymalnie 48 godzin w temperaturze 2-8°C. Hahn i wsp. podają, iż przechowywanie szpiku kostnego w temperaturze pokojowej może być korzystne ze względu na proces fagocytozy bakterii, które mogą zanieczyszczać materiał transplantacyjny. Zjawisko to jest nazywane samosterylizacją. Procedura pozyskania szpiku kostnego jest o wiele bardziej narażona na ryzyko kontaminacji drobnoustrojami. Zauważono również, iż szpik kostny przechowywany w temperaturze pokojowej zawiera więcej leukocytów niż ten przechowywany w 4°C [48]. Pamphilon i wsp. podają, iż warunki przechowywania KK pozyskanych ze szpiku oraz z mobilizowanej krwi obwodowej różnią się ze względu na różny skład tych materiałów. Szpik kostny zawiera więcej krwinek czerwonych, ma mniejsze stężenie komórek jednojądrowych, a także inny skład antykoagulantów. Wykazali również, iż temperatura ma większy wpływ na materiał transplantacyjny pochodzący z mobilizowanej krwi obwodowej niż ze szpiku [35]. Natomiast analiza Thakrala i wsp. wykazała, że szpik kostny zachowuje wysokie parametry ilościowo-jakościowe przez 72h przechowywany w 4°C i 22°C, natomiast parametry ulegają znacznemu pogorszeniu w 37°C [93]. Fry i wsp. twierdzą, iż szpik kostny przeznaczony do podania w ciągu 72 godzin powinien być przechowywany w temperaturze 4°C, aniżeli poddany krioprezerwacji [50].

Określenie optymalnych warunków przechowywania materiału transplantacyjnego jest niezwykle istotne ze względów praktycznych. W badaniach własnych szeroko przeanalizowano zmiany wielu parametrów ilościowo-jakościowych w różnym czasie i temperaturze przechowywania produktu. Dzięki takiemu podejściu można było zauważyć jaka jest ich dynamika i które warunki są akceptowalne. W dzisiejszych czasach, w dobie pandemii koronawirusa, stanęliśmy przed wyzwaniem polegającym na konieczności krioprezerwacji allogenicznych komórek krwiotwórczych. Zamierzeniem przedstawionych badań własnych było, aby uzyskane wyniki pozwoliły na ustalenie granic akceptowalnych w kontekście transportu materiału do naszego ośrodka oraz warunków jego przechowywania.

W badaniach własnych materiał przeszczepowy testowano w dniu kolekcji oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C zgodnie ze schematem badania przedstawionym na rycinie 5. materiał oceniono przed zamrożeniem, następnie próby

poddawano krioprezerwacji i ponownie oceniano je po rozmrożeniu. W badaniach własnych przeanalizowano odsetek komórek CD34+, żywotność komórek jednojądrowych oraz komórek CD34+, potencjał klonogeny, liczbę komórek jednojądrowych, odsetek limfocytów oraz granulocytów.

Ocena żywotności komórek w materiale transplantacyjnym jest ważną częścią analizy jakościowej. Przy użyciu błękitu trypanu metodą mikroskopową można ocenić żywotność wszystkich komórek jednojądrowych. Natomiast wybiórcza analiza żywotności wyłącznie komórek CD34+ jest możliwa dzięki zastosowaniu metody cytometrii przepływowej z użyciem 7-AAD. Obie te metody wzajemnie się uzupełniają i pozwalają na kompleksową ocenę jakościową, niezbędną do kwalifikacji materiału transplantacyjnego. W badaniach własnych do oceny jakościowej użyto obu metod.

W badaniach własnych oceniono żywotność komórek jednojądrowych w teście z błękitem trypanu, przed zamrożeniem. Mediana żywotności komórek jednojądrowych w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C wynosiła w dniu aferezy 100%, po 24h 99% i po 48h 96%. Natomiast w materiale przechowywanym w 20°C wynosiła odpowiednio 100%, 93% oraz 74%. Wartości żywotności uległy istotnemu statystycznie zmniejszeniu. Większy spadek żywotności komórek jednojądrowych nastąpił w 20°C, jednakże nadal są one na wysokim poziomie, powyżej 70%, pozwalającym zakwalifikować je do transplantacji. Natomiast w badaniach Thakrala żywotność komórek jednojądrowych przechowywanych w 4°C przez 72h, ocenianych w świeżym materiale wynosiła powyżej 90% do 48h oraz powyżej 85% do 96h [93]. Pamphilon i wsp. również zauważyli obniżenie wartości żywotności KK przechowywanych w 4°C wraz z upływem czasu, jednakże materiał spełniał kryteria kwalifikacji do przeszczepienia [51]. Kao i wsp. zaobserwowali, iż preparaty przechowywane w mieszaninie Plasmalyte i ACD-A, jako medium zachowywały żywotność komórek jednojądrowych ocenianych z błękitem trypanu powyżej 80% przez 72h w 4°C [36]. Moroff i wsp. również analizowali żywotność komórek jednojądrowych przed zamrożeniem, przechowywanych do 3 dni w 1-6°C i 20°C. W części „A” badania analizowano KK przechowywane przez 3 dni w temperaturze 1-6°C w ośrodku pobierającym, natomiast w części „B” badano materiał transportowany do ośrodka przeszczepiającego przez kuriera w temperaturze 1-6°C. Żywotności komórek jednojądrowych ocenianych w teście z błękitem trypanu w części „A” były na wysokim poziomie, natomiast w części „B” uległy nieznacznemu obniżeniu z 98% dnia 1 do 91% dnia 3 [53].

Następnie przeanalizowano żywotność komórek CD34+, ocenianą metodą cytometrii przepływowej przy użyciu 7-AAD w materiale przeszczepowym przed zamrożeniem. Stwierdzono medianę żywotności wynoszącą 99,89% w materiale w dniu aferezy, 99,8% w materiale przechowywanym przez 24h w 4°C oraz 99,12% w materiale po 48h przechowywania w 4°C. Natomiast w materiale przechowywanym w temperaturze 20°C ocenianym w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania wartość mediany żywotności wynosiła odpowiednio 99,89%, 94,71% oraz 40,06%. Żywotność komórek CD34+ po 48h przechowywania uległa znacznemu obniżeniu. Duży rozrzut żywotności komórek CD34+ po 48h przechowywania może wynikać z właściwości materiału, stanu biologicznego pacjenta czy jednostki chorobowej. W badaniu Moroffa, stwierdzono wysokie wartości żywotności komórek CD34+, utrzymujące się na wysokim poziomie przez 3 dni w temperaturze 1-6°C w miejscu pobrania, podobnie jak w badaniach własnych. Natomiast żywotność komórek CD34+ spadła z 91% do 79% w materiale transportowanym przez kuriera w temperaturze 1-6°C do 3 dni [53]. Według Pamphilon i wsp. KK mogą być z powodzeniem przechowywane w temperaturze 2-6°C przez okres maksymalnie 96h z zachowaniem wysokich parametrów żywotności komórek CD34+ [51]. Antonenas i wsp. podają, iż optymalna temperatura do zachowania wysokiej żywotności KK podczas przechowywania w stanie ciekłym oraz transportu do innego ośrodka wynosi 2-8°C, co ma odzwierciedlenie w badaniach własnych [94]. Kao i wsp. analizowali żywotność komórek CD34+ przechowywanych w 4°C i 20°C do 72h. Zaobserwowali niewielki spadek żywotności komórek CD34+ do 48h przechowywania w 4°C - powyżej 80%, spadek żywotności poniżej 80% nastąpił po 72h. Natomiast znaczny spadek żywotności, poniżej 40%, zaobserwowano w materiale przechowywanym przez 72h w 20°C [36].

Badania własne wykazały, że odsetek komórek CD34+ w materiale przechowywanym w 4°C uległ nieznacznym wahaniom. Wartość mediany odsetka komórek CD34+ w dniu aferezy wynosiła 1,36%, po 24h przechowywania w 4°C wynosiła 1,34%, a po 48h - 1,39%. Natomiast w materiale przechowywanym w temperaturze 20°C odsetek komórek CD34+ uległ istotnemu statystycznie zmniejszeniu, po 24h przechowywania wartość mediany wynosiła 1,28%, natomiast po 48h - 1,2%. Uzyskane wartości świadczą o niekorzystnym wpływie temperatury na odsetek komórek CD34+.

Kluczowe znaczenie dla jakości materiału transplantacyjnego ma wysoki potencjał klonogeny manifestujący się liczbą i jakością utworzonych kolonii. Im

większa liczba prekursorów granulocytarno-monocytowych w przeszczepie tym szybsza rekonstytucja u pacjenta oraz mniejsze ryzyko infekcji i krótszy czas hospitalizacji. W badaniach własnych oceniono liczbę prekursorów CFU-GM przed zamrożeniem po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Wartości mediany wynosiły odpowiednio 419 CFU-GM/10⁵ k.j. w dniu aferezy, 318 CFU-GM/10⁵ k.j. po 24h i 260 CFU-GM/10⁵ k.j. po 48h. Liczba prekursorów uległa zmniejszeniu, jednakże materiał nadal spełniał wszelkie kryteria akceptacji do przeszczepienia. Natomiast w materiale przechowywanym w 20°C wartości mediany liczby prekursorów CFU-GM wynosiły 83 CFU-GM/10⁵ k.j. po 24h przechowywania, po 48h stwierdzono pojedyncze prekursor CFU-GM w materiale. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż materiał przeszczepowy przechowywany w 20°C nie spełnia kryteriów akceptacji celem zakwalifikowania do transplantacji. Podobne wnioski otrzymano w badaniach przeprowadzonych przez Moroffa i wsp., gdzie liczba prekursorów CFU-GM utrzymywała się na wysokim poziomie w materiale przechowywanym przez 3 dni w temperaturze 1-6°C. [53] Pamphilon i wsp. badali zależność między wysokim stężeniem komórek jednojądrowych w preparacie, a potencjałem klonogennym. Po przeanalizowaniu stwierdzili, iż stężenie komórek powyżej 2x10⁸/ml powoduje znaczne obniżenie liczby prekursorów CFU-GM w preparacie, jeśli materiał był przechowywany w temperaturze pokojowej [35]. Thakral i wsp. stwierdzili, iż przechowywanie przeszczepu do 72h w 4°C pozwala na zachowanie potencjału klonogennej komórek krwiotwórczych [93]. Według Fry i wsp. liczba CFU-GM jest najlepszym wskaźnikiem mówiącym o jakości materiału przeszczepowego i zapewniającym szybką rekonstytucję. Fry i wsp. przedstawili procentowy spadek liczby prekursorów CFU-GM. Po 48h przechowywania w materiale ocenianym przed zamrożeniem, przechowywanym w 4°C wynosił on około 30%, natomiast w 20°C -50%. Fry porusza również istotną kwestię, iż próba oceniana w badaniach nie jest do końca reprezentatywna. Analizę przeprowadza się na pilotce o objętości ok. 1 ml, natomiast materiał przeszczepowy jest krioprezerwowany w większych objętościach, stąd możliwość wystąpienia rozbieżności między parametrami ilościowo-jakościowymi ocenianymi w pilotce a faktycznymi parametrami materiału przeszczepowego w worku do głębokiego zamrażania. [50] Jednakże przygotowanie pilotki o większych objętościach wiązałoby się, ze zbyt dużą stratą materiału, która nie jest akceptowalna. Seo i wsp. zaobserwowali, iż liczba prekursorów CFU-GM jest dużo mniejsza w materiale przechowywanym przez noc w temperaturze pokojowej niż w materiale poddanym bezpośrednio preparatyce [52]. Kao i wsp. zaobserwowali, iż bardziej stabilny

w zakresie parametrów ilościowo jakościowych jest szpik kostny w porównaniu z krwią obwodową. Kao i wsp. stwierdzili, iż zawartość kwasu mlekowego w szpiku kostnym jest niższa, niż we krwi obwodowej. Liczba CFU-GM wg. Kao i wsp. nie zmienia się istotnie w materiale pozyskanym z mobilizowanej krwi obwodowej przechowywanym przez 24h w lodówce. Kao w przeprowadzonej analizie zauważył, iż żywotność i liczba komórek CD34+ są na wysokim poziomie nawet po 72h przechowywania. Niestety sytuacja przedstawia się zupełnie inaczej jeśli chodzi o potencjał klonogeny materiału transplantacyjnego. Liczba prekursorów CFU-GM uległa znacznemu zmniejszeniu po 48h w materiale przechowywanym w 4°C. Autor wiąże zaistniałą sytuację z widocznym wzrostem kwasu mlekowego po 48h przechowywania, a co a tym idzie również spadkiem pH. Znaczenie dla parametrów ilościowo-jakościowych może mieć również rodzaj użytego antykoagulantu. W preparatach, w których zastosowano heparynę zawartość kwasu mlekowego była wyższa, niż w przypadku zastosowania ACD-A, jako antykoagulantu [36]. W powszechnej praktyce oznaczenie liczby prekursorów CFU-GM nie jest stosowane, przede wszystkim ze względu na to, iż jest to metoda czasochłonna, wymagająca dużo pracy. Jednakże tylko ocena potencjału klonogennego pozwala w pełni ocenić funkcjonalność komórek zawartych w materiale transplantacyjnym i ich zdolność do odtworzenia hematopoezy u pacjenta. W rozstrzygnięciach, przy uzyskaniu pozostałych wartości charakteryzujących materiał przeszczepowy skrajnie niskich ocena potencjału klonogennego prekursorów układu granulocytarno-monocytowego wydaje się nieodzowna i bardzo pomocna.

Do oceny ilościowej materiału przeszczepowego zaliczamy również analizę liczby komórek jednojądrowych, która jest wyjściową do oceny zawartości komórek CD34+ w końcowym produkcie. Liczba przeszczepionych komórek jednojądrowych ma wpływ na szybkość rekonstrukcji po transplantacji u pacjenta. W badaniach własnych całkowita liczba komórek jednojądrowych w materiale przeszczepowym zwiększyła się wraz z czasem przechowywania zarówno w 4°C jak i 20°C. Jednakże wzrost był niewielki, nieistotny statystycznie, być może wynikający z małej grupy badanej. W badaniach własnych całkowita liczba komórek jednojądrowych nieznacznie wzrosła po 24h i 48h przechowywania w 4°C. Mediana wartości w dniu aferezy wynosiła $18,75 \times 10^9$, po 24h przechowywania w 4°C wynosiła $18,88 \times 10^9$, natomiast po 48h $19,15 \times 10^9$. Natomiast w materiale przechowywanym w 20°C wzrost był większy, jednakże również nieistotny statystycznie. Mediana wartości całkowitej liczby komórek po 24h przechowywania w 20°C wynosiła $19,38 \times 10^9$, a po 48h $20,11 \times 10^9$. W przypadku badań

przeprowadzonych przez Moroffa i wsp. całkowita liczba komórek jednojądrowych nieznacznie maleje wraz z czasem przechowywania w temperaturze 1-6°C. [53] W badaniach Thakrala i wsp. TNC (całkowita liczba komórek jednojądrowych; *ang. total nuclear cells*) po 24h przechowywania w 4°C wzrosło z $4,43 \times 10^8/\text{kg m.c.}$ pacjenta do $4,79 \times 10^8/\text{kg m.c.}$ [93]. Seo i wsp. ocenili liczbę komórek jednojądrowych w dniu pozyskania, która wynosiła $3,82 \times 10^8/\text{ml}$, po 24h przechowywania w 4°C spadła do $3,71 \times 10^8/\text{ml}$, a w materiale przechowywanym w temperaturze pokojowej po 24h wynosiła $3,61 \times 10^8/\text{ml}$ [52]. Bardziej istotne od całkowitej zawartości komórek jednojądrowych jest ich stężenie w produkcie. W badaniach przeprowadzonych przez Watz'a i wsp. stwierdzono, iż jeżeli stężenie komórek jest wyższe niż $3 \times 10^8/\mu\text{l}$, wtedy żywotność komórek po rozmrożeniu jest zdecydowanie mniejsza [38, 97]. W badaniach własnych stężenie komórek w materiale przeznaczonym do krioprezerwacji było mniejsze niż $2 \times 10^8/\text{ml}$. Na podstawie obserwacji we własnym ośrodku wyższe stężenia, powyżej wartości $3 \times 10^8/\text{ml}$, zmniejszają żywotność komórek krwiotwórczych.

Stężenie komórek w preparacie poddanym krioprezerwacji, zgodnie z piśmiennictwem nie powinno przekraczać 3×10^8 komórek jednojądrowych/ml [95]. Również Felix i wsp. pokazali, że stężenie komórek powyżej $2,8 \times 10^8 \text{ k.j./ml}$ opóźnia rekonstytucję u pacjentów pediatrycznych. Natomiast Lin i wsp. nie zauważyli znaczącej różnicy w żywotności komórek powyżej i poniżej wartości $3 \times 10^8 \text{ k.j./ml}$. Zgodnie z praktyką stosowaną w naszym ośrodku, produkty poddawane są krioprezerwacji w stężeniu nie przekraczającym $2 \times 10^8 \text{ k.j./ml}$ [96, 97]. Aby zmniejszyć objętość preparatu do późniejszej krioprezerwacji należy poddać go wirowaniu przy użyciu wirówki preparatywnej. Następnie za pomocą ekstraktora osocza usuwa się jego nadmiar. W badaniach własnych porównano wpływ tej manipulacji na późniejszą jakość materiału transplantacyjnego. Bezwzględna liczba komórek jednojądrowych w preparacie była nieznacznie wyższa w materiale po redukcji osocza niż przed, natomiast bezwzględna liczba komórek CD34+ po redukcji osocza była niższa. Różnice te nie były istotne statystycznie. Nie stwierdzono różnic w odsetku komórek CD34+ przed i po redukcji osocza. Oceniono także żywotność komórek CD34+ przed i po redukcji. Uległa ona nieznacznemu zmniejszeniu.

Podsumowując, procedura zmniejszenia objętości preparatu komórek krwiotwórczych nie wpływa na jakość końcowego produktu. Pozwala natomiast zmniejszyć ilość krioprezerwowanych pojemników, a co za tym idzie ilość miejsc zajmowanych w zbiorniku zasilanym w ciekły azot, ostatecznie zmniejszając koszty

przechowywania. Dodatkową korzyścią płynącą z redukcji osocza jest mniejsza objętość DMSO podawana pacjentowi podczas transplantacji.

Wykorzystanie komórek krwiotwórczych do transplantacji autologicznej jest możliwe dzięki zastosowaniu metody krioprezewacji. Komórki po pozyskaniu są zamrażane, następnie pacjent otrzymuje chemioterapię i w kolejnym etapie jest przeprowadzana procedura transplantacji. Krioprezewacja materiału jest również wykorzystywana w przypadku pozyskania zbyt dużej liczby komórek do transplantacji allogenicznej. Wtedy nadmiar materiału jest zamrażany i w przypadku wznowy u pacjenta może być zastosowany do przeprowadzenia kolejnej transplantacji. W obecnej sytuacji pandemii koronawirusa proces krioprezewacji stał się również nieodłącznym elementem transplantacji allogenicznej. Aby uniknąć sytuacji, w której lekarze byliby zmuszeni podać pacjentowi materiał od osoby zakażonej, po pozyskaniu komórki zamrażane są w ośrodku transplantacyjnym. Takie postępowanie wypracowane zostało w związku z panującymi warunkami pandemii w jakich obecnie znalazły się ośrodki zarówno w kraju jak i zagranicą.

Przebieg zamrażania, pomimo wielu lat stosowania, różni się w wielu ośrodkach transplantacyjnych. Dotychczas nie opracowano standaryzacji pozwalającej na ujednolicenie procesu krioprezewacji. Każdy ośrodek musi sam dostosować swoje procedury tak, aby otrzymać jak najlepszy efekt końcowy, czyli produkt o jak najwyższej jakości, zapewniający szybką rekonstytucję u pacjenta po transplantacji [65]. Wszystkie procesy stosowane w danym ośrodku muszą być zwalidowane i zgodne z systemem zapewnienia jakości. Krioprezewacja komórek krwiotwórczych pozwala na ich późniejsze wykorzystanie. Schłodzenie komórek poniżej 0°C powoduje ich uszkodzenie poprzez zmiany właściwości błon białkowo-lipidowych. Zamrażanie komórki powoduje krystalizację zawartej w niej wody, a tym samym odwodnienie organelli komórkowych. Dochodzi do zaburzenia integralności komórki i zniekształceń cytoszkieletu, aby zapobiec tym procesom konieczne jest zastosowanie krioprotektanta [57].

Materiał transplantacyjny może być zamrażany metodą niekontrolowaną, bądź kontrolowaną. Pierwsza metoda polega na bezpośrednim umieszczeniu materiału transplantacyjnego, po dodaniu krioprotektanta, w zamrażarce niskotemperaturowej, w temperaturze -80°C. Następnie, po upływie 24h preparat jest przenoszony do zbiornika magazynowego, zasilanego w ciekły azot. Materiał poddany krioprezewacji metodą niekontrolowaną wykazuje większe straty komórek w porównaniu z krioprezewacją

metodą kontrolowaną, jednakże można z powodzeniem zastosować go do transplantacji zapewniając rekonstytucję u pacjenta [98]. W poznańskim ośrodku od wielu lat stosuje się programowane zamrażanie produktu. Procedura krioprezerwacji przebiega zgodnie z krzywą przedstawioną na rycinie 16. Optymalną szybkością schładzania, pozwalającą na zachowanie żywych komórek krwiotwórczych jest 1-2°C/min. Po zakończeniu procesu programowanego zamrażania preparaty umieszczane są w zbiorniku magazynowym z monitorowaną temperaturą. Ważne jest, by produkty przemieścić możliwie szybko i nie otwierać zbyt często zbiornika, gdyż nawet kilkusekundowe ocieplenie może mieć niekorzystny wpływ na żywotność komórek. Takie zmiany nie są widoczne gołym okiem, odbywają się na poziomie mikroskopowym [99].

Obecnie za złoty standard jako środek kriochronny uznaje się dimetylosulfotlenek. Jest on krioprotektantem wnikającym przez błonę komórkową do wnętrza komórki. DMSO obniża temperaturę krzepnięcia roztworu, zapobiega tworzeniu wewnątrzkomórkowych kryształów lodu, które prowadzą do uszkodzenia organelli komórkowych. W celu zmniejszenia toksycznego działania DMSO na komórki przed zamrożeniem dimetylosulfotlenek stosuje się w roztworze, jako dodatek do osocza autologicznego, albuminy bądź skrobi hydroksyetylowej. W związku z toksycznym działaniem DMSO również na pacjenta dąży się do zmniejszenia jego stężenia. Obecnie standardowo stosuje się dimetylosulfotlenek w stężeniu 10% [99]. W badaniach własnych również stosowano 10% DMSO. Zastosowanie krioprotektanta w wymienionym stężeniu jest poparte literaturą oraz wieloletnim doświadczeniem w poznańskim ośrodku. Dimetylosulfotlenek wpływa toksycznie na niezamrożone komórki w wysokich temperaturach, dlatego dodawanie mieszaniny krioprotekcyjnej powinno odbywać się w łaźni lodowej. Takie warunki przestrzegane są również w BKM, gdzie standardem jest dodawanie mieszaniny krioprotekcyjnej w środowisku obniżonej temperatury w łaźni lodowej. DMSO powoduje u pacjentów podczas infuzji suchotę w jamie ustnej, nudności, wymioty, tachykardię, a także arytmie serca. W związku z toksycznością dimetylosulfotlenku dąży się do zmniejszenia stężenia krioprotektanta w preparacie do przeszczepienia z zachowaniem właściwości krioprotekcyjnych dla komórek. Aby uniknąć toksycznego działania DMSO u pacjentów można przeprowadzić procedurę odmycia. Abonnenc i wsp. wykonali ten zabieg metodą automatyczną, gdzie średnia strata żywotności komórek wynosiła 11% [44, 65]. Natomiast Cigdem i wsp. zaobserwowali, iż usunięcie DMSO powoduje spadek żywotności komórek z 87% do 81%, jednakże czas rekonstytucji granulopoezy nie ulega

zmianie. Wydłużył się natomiast o dwa dni czas rekonstrukcji układu płytkotwórczego [100]. Z niepublikowanych badań własnych wynika również, że straty komórek spowodowane usuwaniem DMSO poprzez odpłukiwanie są zbyt duże, stąd procedura ta wykorzystywana jest przez macierzysty ośrodek sporadycznie.

W ośrodku własnym zamrożony preparat w metalowej kasce, jest umieszczany w zbiornikach magazynowych zasilanych w ciekły azot. Przechowywanie KK w zbiorniku zasilanym w ciekły azot jest bardziej kosztowne. Zbiorniki magazynowe wymagają jego regularnego uzupełniania. Pomieszczenia, w których znajdują się zbiorniki muszą być dobrze wentylowane, gdyż ulatniający się ciekły azot stwarza bezpośrednie zagrożenie dla życia pracowników znajdujących się w pobliżu. Niewątpliwie dużym plusem korzystania z tej metody jest stabilność temperatury oraz jej utrzymywanie nawet w sytuacji przerwania dostaw energii elektrycznej. W związku z wysokim kosztem przechowywania preparatów w zbiornikach zasilanych w ciekły azot ważnym aspektem jest regularne przeprowadzanie utylizacji preparatów od pacjentów zmarłych. Wiele ośrodków wyznacza również limit czasowy przechowywania preparatów powyżej którego są one poddawane utylizacji. Zazwyczaj jest to okres 5 bądź 10 lat. [101] Alternatywą, stosowaną przez inne ośrodki jest umieszczenie produktu w zamrażarkach niskotemperaturowych w temperaturze -80°C . Metoda niekontrolowanego zamrażania i przechowywania preparatów w temperaturze -80°C może być z powodzeniem stosowana, jeżeli czas przechowywania nie przekracza 6 miesięcy [98].

W poznańskim ośrodku stosowana jest praktyka, że co najmniej dwa tygodnie przed planowanym przeszczepieniem lekarz zgłasza BKM chęć przystąpienia do procedury transplantacji. Bank wdraża postępowanie zmierzające do oceny ilościowej i jakościowej materiału. Personel BKM wykonuje badania z użyciem reprezentatywnej próbki zamrożonej łącznie z materiałem przeszczepowym. Po przeprowadzeniu analizy BKM kieruje do ośrodka przeszczepiającego informację, że przeszczep spełnia wszystkie wymagane kryteria i można rozpocząć procedurę na oddziale. W ośrodku własnym produkt jest rozmrażany na oddziale w łaźni wodnej o temperaturze 37°C , bezpośrednio przy sali chorego. Komórki krwiotwórcze po rozmrożeniu są wrażliwe na uszkodzające je czynniki i mogą ulegać obumarciu pod wpływem działania DMSO. Dlatego materiał transplantacyjny powinien zostać przetoczony choremu w czasie nie przekraczającym 20 minut od rozmrożenia. Jeżeli do transplantacji jest przeznaczona większa liczba pojemników, kolejne pojemniki są rozmrażane po przetoczeniu poprzedniego [37]. Drugą

metodą rozmrażania jest metoda „na sucho”. Rozmrażanie produktu w łaźni wodnej jest niewątpliwie szybsze, jednakże stwarza ryzyko kontaminacji produktu w wodzie. Dlatego, w celu zapobiegnięcia zanieczyszczeniu worków z zamrożonym produktem umieszcza się w jałowym woreczku strunowym. W ośrodku własnym również stosuje się jałowe pojemniki do rozmrażania. Wtedy, nawet w przypadku pęknięcia, jest możliwość „uratowania” części produktu. Rozmrażanie metodą „na sucho” trwa dłużej, jednakże zapewnia większe bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Obecnie nie ma standaryzacji w kwestii wyboru metody rozmrażania. Każdy ośrodek transplantacyjny powinien zwalidować i wdrożyć własny sposób postępowania. Uznaje się, iż metoda rozmrażania nie ma istotnego wpływu na jakość przeszczepu. Ważny jest czas od rozmrożenia preparatu do przetoczenia choremu [65, 99].

W badaniach własnych żywotność komórek jednojądrowych oceniona w teście z błękitem trypanu po rozmrożeniu wynosiła w materiale krioprezerowanym w dobie „0” 84%, po 24h przechowywania w 4°C wynosiła 82%, a po 48h - 79%. Wartości uległy istotnemu statystycznie zmniejszeniu, jednakże żywotność komórek krwiotwórczych pozostawała nadal na wysokim poziomie. W przypadku KK przechowywanych przed zamrożeniem w 20°C, a następnie poddanych krioprezerwacji żywotność komórek jednojądrowych uległa znacznemu, istotnemu statystycznie zmniejszeniu i wynosiła 84% w materiale zamrożonym w dobie „0”, po 24h przechowywania w 20°C -20%, a po 48h -8%. Seo i wsp. stwierdzili, iż bezpieczne jest przechowywanie produktu do 12h w temperaturze pokojowej, natomiast powyżej tego czasu w 4°C. Żywotność komórek jednojądrowych ocenianych z błękitem trypanu po rozmrożeniu wynosiła 84% w materiale krioprezerowanym bezpośrednio po pozyskaniu, 83% w materiale przechowywanym przez noc w 4°C oraz 60% w materiale przechowywanym przed zamrożeniem przez noc w temperaturze pokojowej [52].

Analiza żywotności komórek CD34+ oceniana przy użyciu 7-AAD metodą cytometrii przepływowej w badaniach własnych nie wykazała istotnych statystycznie różnic w żywotności ocenianej po rozmrożeniu w materiale przechowywanym przed zamrożeniem w 4°C. Wartości mediany żywotności wynosiły odpowiednio 99,21% w materiale krioprezerwowanym w dobie „0”, 98,53% w materiale krioprezerwowanym po 24h przechowywania w 4°C i 97,54% w materiale krioprezerwowanym po 48h przechowywania w 4°C. W przypadku materiału przechowywanego przed krioprezerwacją w 20°C żywotność komórek CD34+ uległa bardzo istotnemu statystycznie zmniejszeniu. Po 24h przechowywania w 20 °C mediana

żywołności komórek CD34⁺ oceniona po rozmrożeniu wynosiła 8,6%, natomiast po 48h 0,53%. Uzyskane wartości wskazują na duży wpływ temperatury na jakość materiału transplantacyjnego. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Hornbergera i wsp. czas przechowywania KK przed kriokonserwacją wpływa na żywołność komórek CD34⁺ po ich rozmrożeniu [44]. Seo i wsp. podają, iż najwyższa żywołność jest w preparatach krioprezerwowanych bezpośrednio po pozyskaniu. Jeśli krioprezerwacja nie jest możliwa, wtedy przechowywanie KK w 4°C pozwala zachować żywołność komórek CD34⁺ na poziomie powyżej 80%. Natomiast przechowywanie komórek krwiotwórczych w temperaturze pokojowej i późniejsza jego krioprezerwacja powoduje znaczne straty żywołności komórek CD34⁺. Seo sugeruje, iż spadek żywołności jest związany ze wzrostem kwasu mlekowego, a tym samym spadkiem pH w produkcie [52].

W badaniach własnych dokonano również oceny odsetka komórek w materiale analizowanym metodą cytometrii przepływowej po jego rozmrożeniu, przechowywanym przed krioprezerwacją w 4°C. Wynosił on odpowiednio 1,94% w materiale poddanym krioprezerwacji w dobie „0”, 1,95% po 24h oraz 2,20% po 48h. Zaistniałe różnice nie są istotne statystycznie. Wzrost odsetka komórek CD34⁺ może wynikać z rozpadu dojrzałych granulocytów, które są mniej odporne na zmiany temperatur niż młodsze komórki.

W przypadku prób przechowywanych przed krioprezerwacją w 20°C odsetek komórek CD34⁺ uległ istotnemu statystycznie zmniejszeniu i wynosił odpowiednio w materiale krioprezerwowanym w dobie „0”- 1,94%, po 24h przechowywania przed zamrożeniem oceniony po rozmrożeniu 1,4%, natomiast po 48h - 1,17%. Świadczy to o niskiej odporności komórek CD34⁺ na wysokie temperatury w badanym czasie.

Kolejnym ocenianym parametrem dającym najlepsze odzwierciedlenie jakości krioprezerwowanego materiału ma ocena potencjału proliferacyjnego metodą hodowli *in vitro*. Liczba prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu, krioprezerwowanym w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania w 4°C uległa istotnemu statystycznie zmniejszeniu i wynosiła odpowiednio 414 CFU-GM/15⁵ k.j. w materiale krioprezerwowanym bezpośrednio po pozyskaniu, 320 CFU-GM/15⁵ k.j po 24h przechowywania i 190 CFU-GM/15⁵ k.j po 48h przechowywania. Wszystkie te wartości są na wysokim poziomie, zapewniającym bardzo dobrą jakość materiału transplantacyjnego i pozwalającą zakwalifikować go do przeszczepienia. Natomiast w przypadku materiału krioprezerwowanego po 24h i 48h przechowywania w 20°C

potencjał proliferacyjny uległ znacznemu obniżeniu. W badaniach własnych wartość mediany liczby prekursorów CFU-GM w dobie „0” wynosiła 414 CFU-GM/15⁵ k.j, po 24h przechowywania 6 CFU-GM/15⁵ k.j, natomiast po 48h przechowywania w 20°C nie stwierdzono obecności prekursorów CFU-GM. Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, iż przechowywanie KK w 20°C całkowicie dyskwalifikuje go z procedury transplantacyjnej. Thakral i wsp. w swoich badaniach sugeruje, iż nie ma różnic w liczbie prekursorów CFU-GM w materiale poddanym krioprezerwacji w ciągu 1,5h od pozyskania oraz po 72h przechowywania w 4°C. Przechowywanie preparatów nawet do 96h daje dobry efekt. Dobrym rozwiązaniem pozwalającym utrzymać wysokie parametry ilościowo-jakościowe, stosowanym przez wiele ośrodków, jest dodanie ok. 200ml osocza do preparatu. Osocze, zawierające składniki odżywcze pozwala lepiej zachować KK [93]. Obecnie praktyka dodawania osocza do materiału transportowanego z innych ośrodków jest coraz częściej stosowana. Fry i wsp. porównywali wpływ temperatury przechowywania na potencjał klonogeny. Stwierdzili, iż znacznie większa liczba prekursorów CFU-GM była zaobserwowana w materiale przechowywanym przez 72h w 4°C niż w 20°C [50]. Badania nad wpływem warunków przechowywania były już przeprowadzane w latach ubiegłych. Beaujean podaje, iż liczba prekursorów CFU-GM jest podobna w przypadku materiału przechowywanego w temperaturze 22°C i 4°C przez 24h. Odzysk wynosił 96% dla 4°C i 80% dla 22°C [102]. Seo i wsp. ocenili, iż liczba prekursorów CFU-GM w materiale poddanym krioprezerwacji bezpośrednio po pozyskaniu i przechowywanym przez 24h w 4°C jest podobna. Natomiast przechowywanie produktu w temperaturze pokojowej powoduje znaczne straty potencjału klonogenego. Liczba prekursorów w materiale poddanym krioprezerwacji bezpośrednio po pozyskaniu wynosiła 398 CFU-GMx10⁵/μl, w materiale przechowywanym przez noc w 4°C i poddanym krioprezerwacji wynosiła 350 CFU-GMx10⁵/μl, natomiast w produkcie przechowywanym przez noc w 20°C i krioprezerwowanym wartość wynosiła 16 CFU-GMx10⁵/μl. Tak niska wartość świadczy o istotnym wpływie wysokiej temperatury przechowywania na potencjał klonogeny [52].

W badaniach własnych oceniono również liczbę komórek jednojądrowych w produkcie. Mediana wartości całkowitej liczby komórek jednojądrowych ocenianych w preparacie po rozmrożeniu, krioprezerwowanym bezpośrednio po pozyskaniu oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C wynosiła odpowiednio 19,84x10⁹, 15,38 x10⁹ oraz 17,81 x10⁹. Natomiast w materiale przechowywanym w 20°C i poddanym kioprezerwacji

w dobie „0”, po 24h i 48h przechowywania mediana wartość całkowitej liczby komórek jednojądrowych wynosiła $16,85 \times 10^9$ oraz $17,47 \times 10^9$. Duże znaczenie dla jakości preparatu ma stężenie komórek jednojądrowych. Felix i wsp. podaje również, iż istnieje korelacja między stężeniem komórek w materiale poddanym krioprezerwacji a czasem rekonstytucji. Jeżeli stężenie komórek w krioprezerwowanym produkcie było poniżej $2 \times 10^8/\text{ml}$, wtedy czas rekonstytucji wynosił średnio 9 dni. Po podaniu materiału o stężeniu $2-4 \times 10^8/\text{ml}$, czas rekonstytucji wynosił 12 dni. Natomiast, jeżeli stężenie komórek w krioprezerwowanym materiale było wyższe niż $6 \times 10^8/\text{ml}$, wtedy czas rekonstytucji wynosił 14 dni. [96] Mohammed i wsp. podają, że stężenie komórek w zakresie $1-3 \times 10^8/\text{ml}$ daje lepszą żywotność i odzysk komórek niż w przypadku preparatów mrożonych w stężeniu $3-9 \times 10^8/\text{ml}$. Wyższa żywotność komórek zapewnia szybszą rekonstytucję [103]. Natomiast Ming-Hung Lin podaje, iż stężenie komórek powyżej $3 \times 10^8/\text{ml}$ nie wpływa na jakość komórek krwiotwórczych [97]. W przypadku wysokiego stężenia komórek w preparacie przeznaczonym do krioprezerwacji istnieje duże ryzyko wystąpienia tzw. „clumpingu” po rozmrożeniu, czyli spontanicznej agregacji komórek, która może uniemożliwić przetoczenie materiału transplantacyjnego [65]. Pamphilon i wsp. zaobserwowali, iż stężenie komórek powyżej $2 \times 10^8/\text{ml}$ powoduje znaczący spadek ich żywotności, jednakże zamrożenie produktu o stężeniu $4-5 \times 10^8/\text{ml}$ w przeciągu 4h od zakończenia aferezy skutkuje dobrym odzyskiem [51].

W badaniach własnych oceniono również wartość odsetkową limfocytów w preparacie w zależności od warunków przechowywania. Odsetek limfocytów oceniany w materiale po rozmrożeniu uległ istotnemu statystycznie zwiększeniu, co może świadczyć o ich większej odporności na różne warunki przechowywania. W materiale ocenionym po rozmrożeniu mediana wartości odsetka limfocytów wynosiła odpowiednio 41,2% w materiale krioprezerwowanym w dobie „0”, 38,8%, w materiale krioprezerwowanym po 24h przechowywania w 4°C , 43,5% w materiale krioprezerwowanym po 48h przechowywania w 4°C , 59,2% w materiale krioprezerwowanym po 24h przechowywania w 20°C oraz 72,6% w materiale krioprezerwowanym po 48h przechowywania w 20°C . Zaobserwowane zjawisko ma również związek z morfologią limfocytów, w obrębie których zawierają się komórki CD34+ w zakresie oceny przy użyciu analizatora hematologicznego.

Dodatkowo w badaniach własnych ocenie poddano zawartość odsetkową granulocytów w preparacie w zależności od warunków przechowywania. Odsetek granulocytów oceniony w materiale po rozmrożeniu uległ istotnemu statystycznie

zmniejszeniu. W materiale krioprezerowanym w dobie „0” mediana wartości odsetka granulocytów po rozmrożeniu wynosiła 37,5%, w materiale krioprezerwowanym po 24h przechowywania w 4°C- 42,6%, a w materiale krioprezerwowanym po 48h przechowywania w 4°C - 35,8%, w materiale krioprezerwowanym po 24h przechowywania w 20°C- 15,4% oraz w materiale krioprezerwowanym po 48h przechowywania w 20°C - 6%. Uzyskane w badaniach własnych wartości jasno wskazują, iż dojrzałe granulocyty są znacznie mniej odporne na długi czas przechowywania oraz wysoką temperaturę. Zaistniała sytuacja ma również związek z czasem życia dojrzałych granulocytów, który wynosi we krwi obwodowej około 10 godzin. [104] Wysoka zawartość rozpadłych granulocytów może powodować zjawisko „clumpingu” po rozmrożeniu, co znacznie utrudnia diagnostykę materiału, a w skrajnych przypadkach może uniemożliwiać jego przetoczenie pacjentowi [51].

Na podstawie przeprowadzonych analiz parametrów ilościowo-jakościowych komórek materiału przeszczepowego można stwierdzić, iż temperatura pokojowa niekorzystnie wpływa na jakość przeszczepu. W związku z powyższym wszelkie procedury począwszy od pozyskania przez preparatykę aż do momentu krioprezerwacji powinny być przeprowadzane w możliwie jak najkrótszym czasie.

Kwalifikacja materiału komórek KK do przeszczepienia związana jest z kolejnymi etapami czynności przeprowadzonych w BK, przestrzeganiem ustalonych zasad przetwarzania, testowania, magazynowania i dystrybucji. Kwalifikacja wymaga również stałego kontrolowania procesów, aktualizacji dokumentów zgodnie z którymi pracuje BK. Kwalifikacja to wreszcie i przede wszystkim dostosowanie pracy BK do obowiązujących przepisów i zaleceń organów nadzorujących.

W Polsce każdy preparat komórek krwiotwórczych musi być przyjęty przez bank komórek. Wszystkie banki komórek funkcjonujące na terenie Polski muszą posiadać pozwolenie Ministra Zdrowia wydawane na podstawie pozytywnej opinii Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek (KCBTiK). Jest to jednostka pełniąca merytoryczny nadzór nad bankami komórek. W strukturach BK możemy wyróżnić Osobę Odpowiedzialną, która ma za zadanie kontrolować i nadzorować zgodność wszystkich czynności wykonywanych w banku komórek z Ustawą Transplantacyjną. Dodatkowo w BK funkcjonuje System Zapewnienia Jakości (SZJ), za jego nadzór odpowiada Osoba ds. Jakości. SZJ zawiera Standardowe Procedury Operacyjne, Instrukcje oraz Formularze, które muszą być co najmniej raz w roku aktualizowane. Wszystkie sprzęty

znajdujące się na terenie BK podlegają corocznym przeglądom i kwalifikacji. Personel banku komórek uczestniczy w licznych szkoleniach wewnętrznych, organizowanych w gronie pracowników BK, oraz zewnętrznych, w których uczestniczą również pracownicy jednostek powiązanych. Wszyscy pracownicy banków komórek mają obowiązek raz na dwa lata brać udział w szkoleniu organizowanym przez KCBTiK. Dodatkowo, raz w roku Osoba ds. Jakości wraz z innymi pracownikami przeprowadza walidację wszystkich procesów realizowanych w BK. Wszystkie czynności wykonywane w banku komórek są odnotowywane w przygotowanych formularzach, wraz z numerami serii i datą ważności wszystkich sprzętów medycznych, które miały kontakt z materiałem podczas przeprowadzanej preparatyki komórek krwiotwórczych. Takie działania mają na celu zapewnienie możliwości prześledzenia wszystkich czynności i losów materiału transplantacyjnego nawet wiele lat po zakończeniu czynności preparatywnych. Sprawnie funkcjonujący System Zapewnienia Jakości pozwala na znalezienie przyczyny wystąpienia niezgodności oraz daje możliwość szybkiego wprowadzenia działań korygujących i zapobiegawczych [39]. Wszystkie nałożone rygory, reżimy sanitarne i spełnienie wymogów nałożonych przez SZJ banku komórek mają na celu doprowadzenie do uzyskania najlepszych parametrów ilościowo-jakościowych wydawanych preparatów komórek krwiotwórczych przeznaczonych do przeszczepienia.

Przygotowanie materiału transplantacyjnego wysokiej jakości jest priorytetem i głównym zadaniem banków komórek. To jaki produkt końcowy zostanie uzyskany zależy od wielu czynników. Właściwe przyjmowanie czynnika wzrostu przez pacjenta bądź dawcę, jego płeć i masa ciała, rozpoznanie kliniczne, mają wpływ na to jak wydajna będzie afereza. Liczba uzyskanych komórek CD34+ zależy również od rodzaju separatora, a także czasu trwania leukaferazy. Są to istotne czynniki, na które bank komórek nie ma wpływu. Po pozyskaniu preparat jest dostarczany do BK, gdzie jest oceniany oraz przechowywany do momentu przeszczepienia bądź krioprezerwacji. Niezmiernie ważne dla jakości produktu po rozmrożeniu są temperatura i czas przechowywania preparatu przed jego zamrożeniem. Dodatkowo preparatyka przeprowadzana w banku komórek może wpłynąć na żywotność komórek. Wysoka żywotność komórek przed krioprezerwacją nie daje gwarancji dobrej jakości materiału przeszczepowego po rozmrożeniu. Tu rola banku komórek jest ważna i ze wszech miar istotna. Wszelkie odstępstwa od prawidłowo przeprowadzonych działań zarówno w zakresie pobrania komórek jak i jego dalszej preparatyki mogą mieć ogromny wpływ na przebieg całej procedury transplantacji. Od momentu przyjęcia preparatu do BK

do czasu jego dystrybucji do przeszczepienia działania banku komórek są kluczowe, decydujące o jakości przeszczepu. Przygotowanie przez bank komórek produktu, który ma wysokie parametry ilościowo-jakościowe po rozmrożeniu pozwala wydać produkt wysokiej jakości co może wpłynąć na szybkość rekonstytucji u pacjenta, skrócić czas hospitalizacji, oraz zmniejszyć ryzyko wystąpienia groźnych w okresie około transplantacyjnym infekcji i powikłań.

Przedstawiona w pracy wieloaspektowa analiza czynników wpływających na parametry ilościowo-jakościowe materiału przeznaczonego do przeszczepienia na etapie przed przyjęciem do banku oraz w trakcie bankowania zwraca uwagę na wielowymiarowość zagadnienia. Na wszystkich etapach istotne jest stworzenie Systemu Zapewnienia Jakości i ścisłe jego przestrzeganie. Pozwala to na monitorowanie i analizę drogi od pozyskania materiału komórkowego oraz dalej do jego wydania z banku komórek do transplantacji.

6. Wnioski

1. Użycie separatora Spectra Optia pozwala uzyskać preparaty charakteryzujące się:
 - a) większą objętością
 - b) większą całkowitą liczbą komórek jednojądrowych oraz CD34+
 - c) wyższą żywotnością komórek CD34+
2. Redukcja osocza pozwala na zachowanie wysokiej jakości komórek krwiotwórczych i nie wpływa istotnie na:
 - a) bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych
 - b) bezwzględną liczbę komórek CD34+
 - c) odsetek komórek CD34+
 - d) żywotność komórek CD34+
3. Analiza wpływu warunków przechowywania na parametry ilościowo-jakościowe materiału transplantacyjnego pozwoliła na stwierdzenie, że:
 - a) przechowywanie materiału komórkowego przez ponad 24h przed zamrożeniem w temperaturze pokojowej łączy się z obniżeniem odsetka komórek CD34+
 - b) żywotność komórek CD34+ w materiale przechowywanym w 4°C do 48h była na wysokim poziomie, natomiast w materiale przechowywanym w 20°C uległa istotnemu obniżeniu
 - c) liczba komórek jednojądrowych w materiale przechowywanym przez 48h w 4°C i 20°C ocenianym przed zamrożeniem zwiększyła się, natomiast w materiale ocenianym po rozmrożeniu zmniejszyła się
 - d) żywotność komórek jednojądrowych w materiale przechowywanym w 4°C zarówno przed jak i po rozmrożeniu była na wysokim poziomie, natomiast w materiale ocenianym i przechowywanym w 20°C żywotność komórek jednojądrowych uległa istotnemu zmniejszeniu
 - e) przechowywanie materiału komórkowego w 20°C przez ponad 24h łączy się z istotnym obniżeniem wydajności wzrostu klonalnego, dyskwalifikując preparat z procedury transplantacyjnej
4. Przechowywanie materiału do 48h w 4°C zapewnia wysokie parametry ilościowo-jakościowe

7. Streszczenie

Transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych jest ważnym elementem leczenia chorób hematologicznych. Istotnym jest, by materiał transplantacyjny był jak najwyższej jakości. Niniejsza rozprawa doktorska ma na celu optymalizację warunków pozyskiwania, przechowywania i przetwarzania od momentu pobrania komórek krwiotwórczych do momentu ich krioprezerwacji i przechowywania po zamrożeniu. W pracy dokonano porównania wpływu rodzaju użytego separatora komórkowego na jakość pozyskanego materiału przyjmowanego przez bank komórek. Oceniono również rolę preparatyki w procesie przygotowania przeszczepu, a także dokonano analizy wpływu czasu i temperatury przechowywania preparatów komórek krwiotwórczych na ich parametry ilościowo-jakościowe.

W porównaniu użytych separatorów komórkowych analizie poddano 293 materiały pozyskanych przy użyciu separatorów Cobe Spectra i Spectra Optia. Dokonano analizy objętości preparatów, całkowitej liczby komórek jednojądrowych oraz CD34+, a także ich żywotności przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. W zakresie analizy wpływu procedury redukcji osocza na materiał transplantacyjny porównano parametry 360 prób z których 224 były poddane redukcji osocza. Ocenie poddano bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych oraz CD34+, odsetek komórek CD34+ i ich żywotność przed i po redukcji osocza. W przypadku oceny wpływu czasu i temperatury przechowywania dokonano oceny 31 prób autologicznych komórek krwiotwórczych. W tym zakresie dokonano analizy odsetka komórek CD34+ i ich żywotności metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem 7-aminoaktynomycyny-D oraz wykorzystano test z błękitem trypanu do oceny żywotności komórek jednojądrowych. Oceniono również wzrost klonalny prekursorów CFU-GM. Określono całkowitą liczbę komórek jednojądrowych przy użyciu analizatora hematologicznego. Oceny wyżej wymienionych parametrów dokonano w dniu aferezy oraz po 24h i 48h przechowywania w 4°C i 20°C przed zamrożeniem prób oraz po ich rozmrożeniu. Materiał do badań pozyskano w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej.

W zakresie pozyskania komórek uzyskano istotnie statystycznie większą objętość materiału, bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych oraz komórek CD34+ przy użyciu separatora Spectra Optia. Procedura redukcji osocza nie spowodowała istotnych statystycznie zmian w zakresie liczby komórek jednojądrowych oraz komórek CD34+, odsetka komórek CD34+ oraz żywotności komórek CD34+. Żywotność

komórek jednojądrowych oraz CD34+ oceniana przed zamrożeniem była na wysokim poziomie w 4°C, natomiast uległa istotnemu statystycznie obniżeniu w 20°C. Żywotność komórek CD34+ oceniana po rozmrożeniu uległa istotnemu statystycznie obniżeniu w 20°C, a jej wartość była bliska 0. Potencjał CFU-GM uległ istotnemu statystycznie zmniejszeniu w materiale przechowywanym w 4°C przed zamrożeniem oraz ocenianym po rozmrożeniu, jednakże materiał spełniał kryteria kwalifikujące do przeszczepienia. Natomiast w materiale przechowywanym w 20°C zarówno przed zamrożeniem jak i po rozmrożeniu liczba CFU-GM była istotnie statystycznie obniżona. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż użycie separatora Spectra Optia pozwala uzyskać preparaty o większej całkowitej liczbie komórek jednojądrowych oraz CD34+, przy większej objętości preparatu. Największą bezwzględną liczbę komórek CD34+ uzyskano u mężczyzn z zastosowaniem separatora Spectra Optia, natomiast najmniejszą u kobiet przy użyciu separatora Cobe Spectra. Wiek nie wpływa istotnie statystycznie na wydajność leukaferazy. Redukcja osocza z zastosowaniem obecnie używanej metody i parametrów wirowania pozwala zachować wysoką jakość komórek krwiotwórczych i nie wpływa istotnie na: bezwzględną liczbę komórek jednojądrowych, bezwzględną liczbę komórek CD34+ oraz żywotność komórek CD34+. Na podstawie uzyskanych wyników analizy warunków przechowywania materiału transplantacyjnego można wnioskować, iż w materiale ocenianym po rozmrożeniu, przechowywanym przez 48h w 20°C żywotność komórek jednojądrowych oraz CD34+ uległa istotnemu zmniejszeniu, a potencjał klonogeny CFU-GM oceniany po rozmrożeniu w materiale przechowywanym przez 24h i 48h w 4°C pozwala zakwalifikować materiał do transplantacji. Przechowywanie materiału transplantacyjnego przez 24h i 48h w 20°C powoduje znaczne zmniejszenie potencjału klonogennego, dyskwalifikując produkt z procedury transplantacyjnej. Natomiast przechowywanie materiału do 48h w 4°C zapewnia wysokie parametry ilościowo-jakościowe.

Przedstawiona w pracy wieloaspektowa analiza czynników wpływających na parametry ilościowo-jakościowe materiału przeznaczonego do przeszczepienia na etapie przed przyjęciem do banku oraz w trakcie bankowania zwraca uwagę na wielowymiarowość zagadnienia. Zarówno pozyskanie, warunki przechowywania materiału jak i preparatyka oraz właściwe przeprowadzenie procedury krioprezervacji mają istotne znaczenie w przygotowaniu produktu o wysokich parametrach ilościowo-jakościowych, pozwalających na bezpieczne przeprowadzenie procedury transplantacyjnej.

8. Summary

Hematopoietic stem cell transplantation is an important element of the treatment of hematologic diseases. It is essential that the transplantation material is of the highest possible quality. This dissertation aims to optimize the conditions of hematopoietic stem cell procurement, storage and processing from the time of hematopoietic cell collection to cryopreservation and post-freezing storage. The thesis compares the effect of the type of cell separator used on the quality of the obtained material accepted by the cell bank. The role of preparation in the process of transplant preparation was also evaluated, and the influence of storage time and temperature of hematopoietic cell preparations on their quantitative and qualitative parameters was analyzed.

In comparison of cell separators used, 293 materials obtained with Cobe Spectra and Spectra Optia separators were analyzed. The volume of the preparations, the total number of mononuclear and CD34⁺ cells, and their viability before and after thawing were analyzed. In terms of analyzing the effect of the plasma reduction procedure on the transplantation material, the parameters of 360 samples were compared, 224 of which underwent plasma reduction. The absolute number of mononuclear and CD34⁺ cells, the percentage of CD34⁺ cells and their viability before and after plasma reduction were evaluated. For the evaluation of the effect of storage time and temperature, 31 autologous hematopoietic cell samples were evaluated. In this regard, the percentage of CD34⁺ cells and their viability were analyzed by flow cytometry using 7-aminoactinomycin-D and a trypan blue assay was used to assess the viability of mononuclear cells. An in vitro culture technique was used to determine the clonal growth of CFU-GM precursors. The total number of mononuclear cells was determined using a hematology analyzer. The above mentioned parameters were evaluated on the day of apheresis and after 24h and 48h of storage at 4°C and 20°C before and after freezing the samples. The material for the study was obtained in the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation based on the consent of the Bioethics Committee.

In terms of cell acquisition, a statistically significantly higher volume of material, absolute number of mononuclear cells and CD34⁺ cells were obtained using Spectra Optia separator. The plasma reduction procedure did not result in statistically significant changes in the number of mononuclear cells and CD34⁺ cells, the percentage of CD34⁺ cells and the viability of CD34⁺ cells.

The viability of mononuclear and CD34+ cells assessed before freezing was at a high level during the following days of storage at 4°C but decreased significantly at 20°C. The viability of CD34+ cells assessed after thawing was statistically significantly decreased at 20°C and was close to 0. The CFU-GM potential was statistically significantly decreased in the material stored at 4°C before freezing and after thawing, but the material fulfilled the criteria for transplantation. On the other hand, in the material stored at 20°C both before freezing and after thawing the number of CFU-GM was statistically significantly reduced.

On the basis of the obtained results we can conclude that the use of Spectra Optia separator allows to obtain preparations with a higher absolute number of mononuclear cells and CD34+ cells, with a larger volume of the preparation. The highest absolute number of CD34+ cells was obtained in men using the Spectra Optia separator, while the lowest in women using the Cobe Spectra separator. Age does not have a statistically significant effect on leukapheresis yield. Plasma reduction with the currently used method and centrifugation parameters preserves high quality of hematopoietic cells and does not significantly affect: the absolute number of mononuclear cells, the absolute number of CD34+ cells and the viability of CD34+ cells. On the basis of the obtained results of the analysis of the storage conditions of transplantation material it can be concluded that in the material evaluated after thawing, stored for 48 hours at 20°C, the viability of mononuclear cells and CD34+ cells decreased significantly, and the clonogenic potential of CFU-GM evaluated after thawing in the material stored for 24 and 48 hours at 4°C allows to qualify the material for transplantation. Storage of the transplant material for 24 h and 48 h at 20°C results in a significant decrease in the clonogenic potential, disqualifying the product from the transplantation procedure. On the other hand, storing the material up to 48h at 4°C ensures high quantitative and qualitative parameters.

The multifaceted analysis of factors affecting the quantitative and qualitative parameters of the material intended for transplantation at the stage before and during banking, presented in this paper, highlights the multidimensionality of the issue. The acquisition and storage conditions of the material, as well as the preparation and proper performance of the cryopreservation procedure are of significant importance for the preparation of a product with high quantitative and qualitative parameters, allowing for a safe transplantation procedure.

9. Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej- podział w zależności od użytego separatora komórkowego.	41
Tabela 2. Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem preparatywnej redukcji osocza.....	42
Tabela 3. Charakterystyka grupy badanej- różne warunki przechowywania komórek krwiotwórczych.	43
Tabela 4. Porównanie objętości preparatów pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	59
Tabela 5 Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	61
Tabela 6. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.	62
Tabela 7. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych przed zamrożeniem pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	63
Tabela 8. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	65
Tabela 9. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych. ...	66
Tabela 10. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz wieku- regresja wieloraka.....	67
Tabela 11. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ w zależności od rodzaju użytego separatora oraz płci- regresja wieloraka.....	68
Tabela 12. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w materiale prze i po redukcji osocza	70
Tabela 13. Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza	71
Tabela 14. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza.....	72
Tabela 15. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza.....	73
Tabela 16. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	74

Tabela 17. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.	75
Tabela 18. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C... 76	76
Tabela 19. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.	76
Tabela 20. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	78
Tabela 21. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.	79
Tabela 22. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C. 79	79
Tabela 23. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. ...	81
Tabela 24. Porównanie wielokrotne odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.	81
Tabela 25. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	83
Tabela 26. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.	83
Tabela 27. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	84
Tabela 28. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.	85
Tabela 29. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	86

Tabela 30. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	87
Tabela 31. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.	88
Tabela 32. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	89
Tabela 33. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. ...	90
Tabela 34. Porównanie wielokrotne żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	90
Tabela 35 Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	92
Tabela 36. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	94
Tabela 37. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	94
Tabela 38. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C...	96
Tabela 39. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	96
Tabela 40. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	98
Tabela 41. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C. ...	100
Tabela 42. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	100

Tabela 43. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. .	102
Tabela 44. Porównanie wielokrotne żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	102
Tabela 45. porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	104
Tabela 46. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C..	106
Tabela 47. Porównanie wielorotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	107
Tabela 48. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.	108
Tabela 49. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	109
Tabela 50. porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	111
Tabela 51. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C. ..	112
Tabela 52. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	113
Tabela 53. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C. .	115
Tabela 54. Porównanie wielokrotne liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	115
Tabela 55. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	117

Tabela 56. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	119
Tabela 57. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	119
Tabela 58. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	120
Tabela 59. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	121
Tabela 60. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.....	123
Tabela 61. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	124
Tabela 62. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	125
Tabela 63. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	126
Tabela 64. Porównanie wielokrotne całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	127
Tabela 65. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.....	128
Tabela 66. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	129
Tabela 67. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	131

Tabela 68. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	132
Tabela 69. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.	133

10. Spis rycin

Rycina 1. Uproszczony schemat hematopoezy (schemat własny)	13
Rycina 2. Zakres działalności Banku Komórek Macierzystych w Poznaniu (schemat własny).....	22
Rycina 3. Czynniki wpływające na parametry ilościowo-jakościowe komórek krwiotwórczych (schemat własny)	23
Rycina 4. Schemat badania	44
Rycina 5. Separator komórkowy- Cobe Spectra (zdjęcie własne).....	46
Rycina 6. Separator komórkowy- Spectra Optia (zdjęcie własne)	46
Rycina 7. Analizator hematologiczny ABX Micros 60 (zdjęcie własne).....	47
Rycina 8. Przykładowy obraz cytometryczny (zdjęcie własne)	49
Rycina 9. Komora laminarna z pionowym przepływem jałowego powietrza (zdjęcie własne).....	50
Rycina 10. Kolonie utworzone przez prekursorzy granulocytno-monocytny (CFU-GM) - zdjęcie uzyskane z mikroskopu odwróconego (zdjęcie własne)	51
Rycina 11. Metoda oceny żywotności komórek z błękitem trypanu (zdjęcie własne)...	52
Rycina 12. Przykładowy obraz cytometryczny- ocena żywotności komórek CD34+ z 7 -AAD (zdjęcie własne).....	53
Rycina 13. Wirówka preparatywna Heraeus Cryofuge 5500i (zdjęcie własne)	54
Rycina 14. Redukcja osocza przy użyciu ręcznego ekstraktora osocza. (zdjęcie własne).....	54
Rycina 15. Krzywa zamrażania- metoda kontrolowana (zdjęcie własne)	56
Rycina 16. Zbiorniki magazynowe zasilane w ciekły azot (zdjęcie własne).....	56
Rycina 17. Uproszczony schemat badania	58

11. Spis wykresów

Wykres 1. Porównanie objętości preparatów pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	60
Wykres 2. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych	61
Wykres 3. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych	62
Wykres 4. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych przed zamrożeniem pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	64
Wykres 5. Porównanie żywotności komórek CD34+ ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych.....	65
Wykres 6. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych ocenionych po rozmrożeniu pozyskanych przy użyciu dwóch różnych separatorów komórkowych	66
Wykres 7. Porównanie całkowitej liczby komórek CD34+ pozyskanej przy użyciu dwóch różnych separatorów w zależności od płci.....	69
Wykres 8. Porównanie bezwzględnej liczby komórek jednojądrowych w materiale prze i po redukcji osocza	70
Wykres 9. Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza	71
Wykres 10. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza.....	72
Wykres 11. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale prze i po redukcji osocza.....	73
Wykres 12. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	75
Wykres 13. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C...	77
Wykres 14. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	78
Wykres 15. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C	80

Wykres 16. Porównanie odsetka komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C	82
Wykres 17. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C	84
Wykres 18. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C	86
Wykres 19. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	87
Wykres 20. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C .	89
Wykres 21. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C	91
Wykres 22. Porównanie żywotności komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	92
Wykres 23. Wpływ czasu i temperatury przechowywania na żywotność komórek jednojądrowych po rozmrożeniu- analiza poszczególnych prób	93
Wykres 24. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	95
Wykres 25. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób	95
Wykres 26. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C...	97
Wykres 27. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób	98
Wykres 28. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	99
Wykres 29. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C	101

Wykres 30. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób	101
Wykres 31. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C ..	103
Wykres 32. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób	103
Wykres 33. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	105
Wykres 34. Porównanie żywotności komórek CD34+ w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C- analiza poszczególnych prób	105
Wykres 35. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C ..	107
Wykres 36. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób	108
Wykres 37. Wykres ramka-wąsy -porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C	109
Wykres 38. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób	110
Wykres 39. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	111
Wykres 40. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C ...	113
Wykres 41. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C- analiza poszczególnych prób	114
Wykres 42. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C .	116

Wykres 43. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C- analiza poszczególnych prób	116
Wykres 44. Porównanie liczby prekursorów CFU-GM w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	118
Wykres 45. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	120
Wykres 46. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	122
Wykres 47. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.....	123
Wykres 48. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C.....	125
Wykres 49. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 20°C.....	127
Wykres 50. Porównanie całkowitej liczby komórek jednojądrowych w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.....	128
Wykres 51. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	130
Wykres 52. Porównanie odsetka limfocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	131
Wykres 53. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym przed zamrożeniem w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	132
Wykres 54. Porównanie odsetka granulocytów w materiale ocenianym po rozmrożeniu w dobie „0” oraz po 24h i 48h przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	134

12. Piśmiennictwo

1. Moore M.A.: Putting the neo into neoangiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109:313-315
2. Olson OC., Kang YA., Passeque E. Normal Hematopoiesis is a Balancing Act of Self-Renewal and Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020 Jan 27. Pii: a035519. Doi: 10.1101/cshperspect.a035519
3. Lysenko V., McHugh D., Behrmann L., Roachat MA. Et al. Humanised mouse models for haematopoiesis and infectious diseases. *Swiss Med Wkly.* 2017 Oct.22; 147:w14516
4. Kozłowska-Skrzypczak M., Komarnicki M., Hematopoetyczne komórki macierzyste i krwiotworzenie. *Diagn. Lab.*, 2008; 44, 231-239
5. Giering A., Bogunia-Kubik K., Znaczenie interakcji między DSF-1 i CXCR4 w hematopoezie i mobilizacji macierzystych komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej. *Postępy Hig Med. Dośw.*, 2007; 61:369-383
6. Wang H., Leng Y., Gong Y. Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:694
7. Lucas D. The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1041:5-18
8. May M., Slaughter A., Lucas D. Dynamic regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow niches. *Curr Stem Cell Rep.* 2018 Sep;4(3):201-208
9. 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 Apr 19;9(1):e2017032
10. Kopeć-Ślęzak J. Krwiotwórcza komórka macierzysta w niszy szpikowej. *Journal of Transfusion Medicine* 2011, tom 4, nr 3, 129-135
11. http://www.poltransplant.org.pl/statystyka_2020.html

12. <https://www.medgadget.com/2020/12/latest-research-on-hematopoietic-stem-cell-transplantation-market-size-share-2020-global-growth-key-company-profile-analysis-developments-trends-business-strategies-opportunities-future-pl.html>

13. Passweg J.R., Baldomero H., Chabannon C. et al. The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CART-T's come into focus. Bone Marrow Transplant 2020 Aug; 55(8):1604-1613

14. Giebel S. Postępy w przeszczepianiu krwiotwórczych komórek macierzystych. Hematologia 2015, tom 6, nr 1, 85-89

15. Styczyński J. Bezpieczeństwo dawców krwiotwórczych komórek macierzystych. Hematologia 2012, tom 3, nr 1, 58-65

16. Panch S. R., Szymanski J., Savani B. N., Stroncek D. F. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. Biol. Blood Marrow Transplant 2017 Aug; 23(8):1241-1249

17. Klein G. Wuchter P. Stem Cell Mobilization Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 2017 Anthony D. Ho Evolution of Peripheral Blood Stem Cell Transplantation

18. Hubel K. Mobilization and Collection of HSC. EBMT Handbook 2019 (15)

19. Duong H. K., Savani B. N., Copelan Ed, Devine S. et al. Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from American Society for Blood and Marrow Transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant 20 (2014) 1262-1273

20. Borowska H., Klimek P., Cioch M. Otrzymywanie obwodowych komórek krwiotwórczych oraz badanie ich żywotności w produkcji aferezy przed i po kriokonserwacji. Diagn. Lab 2014; 50(3): 249-254

21. Basak G. W., Jędrzejczak W. W. Mobilizacja krwiotwórczych komórek macierzystych- wczoraj i dziś. Hematologia 2012, tom 3, nr 1, 9-24

-
22. Sanz J., Veys P., Rocha V. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies 2019, 7th Edition Chapter 64. Umbilical Cord Blood Transplantation in Children and Adults.
23. Urbanowska E. Bankowanie materiału komórkowego wykorzystywanego do przeszczepów szpiku. *Diag. Lab.* 2012 (26): 26-27
24. Kallur T., Blomberg P., Stenfelt S., Tryggvason K. et. al. Quality Assurance in Stem Cell Banking: Emphasis on Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1590:11-16
25. de Haan G., Lazare S. S. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood* 2018 Feb 1;131(5):479-487
26. Engelhardt M., Bertz H., Wasch., Finke J., Analysis of stem cell apheresis products using intermediate-dose filgrastim plus large volume apheresis for allogeneic transplantation , *Annals of Hematology* 2001, t.80, n.4, s.201-208
27. Hsu Y.-M., Cushing M.M. Autologous Stem Cell Mobilization and collection. *Hematol Oncol Clin North AM* 2016 Jun;30(3):573-89
28. Kreśnik P. K., Krasna M., Rozman P., Vrtovec B. et al. Collection and Immunoselection of CD34+ Cells: The Impact of Age, Sex, and Diabetes in Patients With Chronic Heart Failure. *Transfusion* Jul; 2016, 56(7):1792-800
29. Verlinden A., Van de Velde A., Verpooten G. A., Janssen van Doorn K. Determining Factors Predictive of CD34+ Cell Collection Efficiency in an Effort to Avoid Extended and Repeated Apheresis Sessions *J. Clin. Apher.* 2013 Dec;28(6):404-10
30. Chen J., Burns K.M., Babic A., Donor body mass index is an important factor that affects peripheral blood progenitor cell mobilization with granulocyte-colony-stimulating factor, *Transfusion*, 2014, v.54, s.203-210
31. Lee Se-Na., Yeon Sohn Ji., Kong J. H., Eom S. H. et al. Comparison of Two Apheresis Systems of COBE and Optia for Autologous Peripheral Blood Stem Cell Collection. *Ann. Lab. Med.* 2017 Jul; 37(4): 327-330

-
32. Yanchun L. Jie L., Reeves H. M., Reyes R. et al. Comparison of Two Apheresis Systems During Hematopoietic Progenitor Stem Cell Collections at a Tertiary Medical Center. *Transfusion* 2016 Nov;56(11):2833-2838
33. Maitta W. R. Current state of apheresis technology and its applications. *Transfus Apher Sci* 2018 Oct; 57(5):606-613
34. Tekgündüz S. A., Özbek N. ABO blood group mismatched hematopoietic stem cell transplantation 2016 FEB;54(1):24-9
35. Pamphilon DH., Selogie E., Szczepiorkowski ZM. Transportation of cellular therapy products: report of a survey by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) collaborative. *Vox Sang.* 2010 Aug 1;99(2):168-73
36. Kao GS., Kim HT., Daley H., Ritz J. et al. Validation of short-term handling and storage conditions for marrow and peripheral blood stem cel products. *Transfusion* 2011 Jan; 51(1):137-47
37. Wuchter P. Processing, Cryopreserving and Controlling the Quality of HSCs. The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies &th edition Ch: Springer; 2019 Chapter 17
38. Watz E, Remberger M., Ringden O. et al. Quality of the hematopoietic stem cell graft affects the clinical outcome of allogeneic stem cell transplantation. *Transfusion* 2015 Oct; 55(10): 2339-50 *Transfusion*
39. Watts MJ., Linch DC. Optimisation and quality control of cel processing for autologous stem cel transplantation. *Br J Haematol.* 2016 Dec;175(5):771-783
40. Król M.A., Urbanowska E., Feliksbrod M. E., Blajer B. i wsp. Fenotypowa charakterystyka komórek CD34+ uzyskiwanych z krwi pępowinowej i z produktu leukaferazy od zdrowych dawców po mobilizacji czynnikiem wzrostu. *Adv Clin Exp Med.* 2005, 14, 5, 883-890
41. Sutherland D. R., Keeney M., Gratama J. W. Enumeration of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Curr Protoc. Cytom.* 2003 Aug;Chapter6:Unit 6.4.
Curr Protoc Cytom

-
42. Vadakke-Madathil S., Limaye L. S., Kale V., P. et al. Flow Cytometry and Cell Sorting Using Hematopoietic Progenitor Cells Methods Mol. Biol. 2019;2029:235-246
Methods Mol Biol
43. Bojanic I., Besson N., Vidovic I., Cepulic B., G. Performance Prediction Algorithm for Autologous PBSC Collection in Adults and Pediatric Patients Using Large Volume Leukapheresis. J. Clin. Apher. 2019 Aug;34(4):407-415
44. Hornberger K., Yu G., McKenna D., Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emergnig Assays, Cryoprotectant Agents and Technology to Improve Outcomes. Transfus Med. Hemother. 2019 Jun;46(3): 188-196
45. Ilnicki K., Urbanowska E. Występowanie zjawiska spontanicznej agregacji w preparatach kriokonserwowanych komórek jądrowych krwi pępowinowej. Acta Haematologica Polonica 2006, 37, nr 3: 361-371
46. Cordoba R., Arrieta R., Kerguelen A., Hernandez-Navarro F. The Occurrence of Adverse Events During the Infusion of Autologous Peripheral Blood Stem Cells Is Related to The Number of Granulocytes in the Leukapheresis Product. Bone Marrow Transplant 2007 Dec;40(11):1063-7
47. Holbro A., Baldomero H., Lanza F. et al. Handling, processing and disposal of stem cell products in Europe: A survey by the cellular therapy and immunobiology working party of European Society for Blood and Marrow Transplantation. Cytotherapy 2018 Mar;20(3):453-460
48. Hahn S., Sireis W., Hourfar K. et al. Effects of storage temperature on hematopoietic stability and microbial safety of BM aspirates. Bone Marrow Transplant 2014 Mar;49(3):338-
49. Schwandt S., Liedtke S., Kogler G. The influence of temperaturę treatment before cryopreservation the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34+ and CD45+ cord blood cells. Cytotherapy, 2017; 19:962-977
50. Fry LJ., Giner SQ., Gomez SG., Green M et al. Avoiding room temperature storage and delayed cryopreservation provide better postthaw potency in hematopoietic progenitor cell grafts. Transfusion 2013 Aug;53(8):1834-42

-
51. Pamphilon D., Mijovic A. Storage of hematopoietic stem cells. *Asian J Transfus Sci.* 2007 Jul;1(2):71-6
52. Seo JY., Huh HJ., Park HK, Choung HK et al. Evaluation of overnight storage conditions for autologous peripheral blood stem cel products: comparison of three different conditions. *Vox Sang* 2012 Aug; 103(2):150-8
53. Moroff G., Seetharaman S., Kurtz JW., Greco NJ et al. Retention of cellular properties of PBPCSs following liquid storage and cryopreservation. *Transfusion* 2004 Feb;44(2):245-52
54. <https://wmda.info/professionals/quality-and-accreditation/wmda-standards/>
55. https://www.ebmt.org/sites/default/files/migration_legacy_files/news/FACT-JACIE%207th%20Edition%20DRAFT%20Manual.05.01.17.pdf
56. <https://pl.wikipedia.org/wiki/Dimetylosulfotlenek>
57. Niwińska A. Przegląd metod kriokonserwacji pod kątem techniki witryfikacyjnej. *Życie Weterynaryjne* 2016 91(7)
58. Abonnenc M., Pesse B., Tissot JD., Barelli S. et al. Automatic wasching of thawed haematopoietic progenitor cel grafts: a preclinical evaluation. *Vox Sang.* 2017 May; 112(4):367-378
59. Pavel P., Laier S. A Freezing Protocol for Hematopoietic Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2019;2017:177-192
60. Kudo Y., Minegishi M., Itoh T., Miura J. et al. Evaluation of hematological reconstitution potential of autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved by a simple controlled-rate freezing method. *Tohoku J Exp Med.* 2005 Jan; 205(1):37-43
61. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol Biol.* 2017; 1590:41-77

-
62. Borowska H., Klimek P., Cioch M. Otrzymywanie obwodowych komórek krwiotwórczych oraz badanie ich żywotności w produkcji aferezy przed i po krioprezewacji. *Diagn Lab* 2014; 50(3): 249-254
63. Fernyhough L.J., Buchan V.A., McArthur L.T., Hock B. D. Relative recovery of hematopoietic stem cel products after cryogenic storage of up to 19 years. *Bone Marrow Transplant* 2013 Jan; 48(1):32-5
64. Yuan Y., Yang Y., Tian Y., Park J. et al. Efficient Long-Term Cryopreservation of Pluripotent Stem Cells at -80°C. *Sci. Rep.* 2016 Oct 3;6:34476
65. Lecchi L., Giovanelli S., Gagliardi B., Pezzali I. et al. An update on methods for cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2016 Jun(3):324-36
66. Triana E., Ortega S., Azqueta C., Pomares H. et al. Thawing of cryopreserved hematopoietic progenitor cells from apheresis with a new dry-warming device. *Transfusion* 2013 Jan;53(1):85-90
67. Grubovic R. M., Georgievski B., Cevreska L. et al. Analysis of factors that influence hematopoietic recovery in autologous transplanted patients with hematpoietic stem cells from peripheral blood. *J Med Sci* 2017 Jun 3;5(3):324-331
68. Crowley L. C., Marfell B. J., Christensen M. E. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2016 Jul 1;2016(7)
Cold Spring Harb Protoc
69. Chan LL., Rice WL., Qiu J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS One* 2020 Jan 24;15(1)
70. Mascotti K., McCullough J., Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* 2000 Jun; 40(6):693-6
71. Kapoor S., Shenoy S.P., Bose B. CD34 cells in somatic, regenerative, and cancer stem cells: Developmental biology, celltherapy and omics big data perspective. *J Cell Biochem* 2019; 1-12

-
72. Watts MJ., Linch DC. Optimisation and quality control of cel processing for autologous stem cel transplantation. *Br J Haematol* 2016 Dec; 175(5):771-783
73. Chan LL., McCulley KJ., Kessel SL. Assesment of Cell Viability with Single-, Dual- and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 16601:27-41
74. Velier M., Chateau AL., Malenfant C., Quffai S. et al. Validation of a semi automatic device to standarize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cel products. *Cytotherapy* 2019 Aug; 21(8):820-823
75. Yang H., Acker JP., Cabuhat M., Letcher B. et al. Association of post-thaw viable CD34+ cells CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant* 2005 May; 35(9):881-7
76. Hamadani M., Zhang M.-J., Tang X.-Y., Fei M. et al. Graft cryopreservation does not impact overall survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation using post-transplantation cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020 Jul; 26(7):1312-1317
77. Devine S.M. Transplantation of alogeneic cryopreserved hematopoietic cell grafts during the Covid-19 pandemic: A National Marrow Donor Program perspective *Am J Hematol* 2021 Feb 1;(2):169-171
78. <https://network.bethematchclinical.org/transplant-centers/nmdp-standards/>
79. Bazinet A., Popradi G. A general practitioner`s guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol* 2019 Jun;26(3):187-191
80. Connie J Eaves Hematopoietic stem cels: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015 Apr 23;125(17):2605-13
81. Gallardo D., de la Calamara R., Nieto J.B. et al. Is mobilized peripheral blood comparable with bone marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation from HLA-identical sibling donors? A case-control study. *Haematologica* 2009 Sep;94(9):1282-8

-
82. Kriegsmann K., Wuchter P. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells in adults: focus on timing benchmarking. *Methods Mol Biol* 2019;2017:41-58
83. Dorshkind K., Höfer T., Montecino-Rodriguez E. et al. Do hematopoietic stem cells age? *Nat Rev Immunol* 2020 Mar;20(3):196-202
84. Lenk J., Bornhauser M., Kramer M., Holig K. et al. Sex and body mass index but not CXCL12 801 G/A polymorphism determine the efficiency of hematopoietic cell mobilization: a study in healthy volunteer donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013 Oct; 19(10):1517-21
Biol Blood Marrow Transplant
85. Lopez-Pereira P., Aparicio E. S., Andres I. V. et al. Retrospective comparison between COBE SPECTRA and SPECTRA OPTIA apheresis systems for hematopoietic progenitor cells collection for autologous and allogeneic transplantation in a single center. *J Clin Apher* 2020 Aug 15 ; online ahead of print
86. Dhawan Setia R., Arora S., Handoo A., Dadu T. et al. Comparison of Amicus and COBE Spectra for allogeneic peripheral blood stem cell harvest: Study from tertiary care centre in India. *Transfus Apher Sci* 2017 Jun;56(3):439-444
87. Stenzinger M., Bonig H. Risk of leukapheresis and how to manage tchem-A non-systematic review. *Transfus Apher Sci* 2018 Oct;57(5):628-634
88. Mathur G., Mott S.L., Collins L. et al. Factors influencing platelet clumping during peripheral blood hematopoietic stem cell collection. *Tranfusion* 2017 May;57(5):1142-1151
89. Deneys V., Fabry A., Van Hooydonk M., Sonet A. Efficiency of autologous stem cell collection: Comparison of three different cell separators. *Transfus Apher Sci* 2017 Feb;56(1):35-38
90. Pandey S., Cottler-Fox M. Optia continuous mononuclear collection (CMNC) system is a safe and efficient system for hematopoietic progenitor cells-apheresis (HPC-a) collection and yields a lower product hematocrit (HCT%) than the Cobe Spectra system: A retrospective study. *J Clin Apher* 2018 Aug;33(4):505-513

-
91. Parkhideh S., Chegeni R., Mehdizadeh M. et al. Effects of AB0 incompatibility on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2020 Apr;59(2):102696
92. Kozłowska-Skrzypczak M., Bembnista E., Kubiak A., Matuszak P. Microbial contamination of peripheral blood and bone marrow hematopoietic cel products and environmental contamination in a stem cel bank: a single-center report. *Transplant Proc* 2014 /oct;46(8):2873-6
93. Thakral B., Saluja K., Sharma R.R. et al. Extended Storage of Liquid-Preserved Stem Cels at 4°C Results in Good Engraftment in Patients of Multiple Myelomas Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation *LABMEDICINE* 2005; Volume 36 Number 10
94. Antonenas V., Garvin F., Webb M. et al. Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-reated loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy* 2006;8(2):158-65
95. Rebar N.M., Dereen A., Najmaddin K. et al. Leukapheresisi cel concentration adjustment required for a successful recovery of HSC after cryopreservation. *Cryobiology* 2020 Feb 1;92:21-25
96. Felix O. M. W., Tunes G., Ginani V. C. et al. The influence of cel concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cel transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther* 2018 Jul-Sep;40(3):233-239
97. Ming-Hung Lin D., Hiskey M., Huang J. et al. Effect of high nucleated cell concentration on product viability and hematopoietic recovery in autologous transplantation. *Transfusion* 2020, Mar;60(3):575-581
98. Setia R. D., Arora S., Handoo A. Outcome of 51 autologous peripheral blood stem cell transplants after uncontrolled-rate freezing (“dump freezing”) using -80°C mechanical freezer. *Asian J Trnasfus Sci* Jul-Dec 2018;12(2):117-122

-
99. Meneghel J., Kilbride P., Morris G.J. Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies-A Review Front Med 2020 Nov 26;7:592242
100. Akkok A. C., Holte M. R., Tangen J. M. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide- depleted autologous peripheral blood progenitor cells. Transfusion 2009 Feb;49(2):354-61
101. Krummradt F., Sauer S., Pave P. et al Storage, Utilization, and Disposal of Hematopoietic Stem Cell Products in Patients with Multiple Myeloma. Biol Blood Marrow Transplant 2020 Sep;26(9):1589-1596
102. Beaujean F., Pico J., Norol F et al. Characteristics of peripheral blood progenitor cells frozen after 24 hours of liquid storage. J hematother. 1996 Dec;5(6):681-6
103. R. N. Mohammed, D. Ahmad, N. Khoshnaw et al. Leukapheresis cell concentration adjustment required for a successful recovery of HSC after cryopreservation. Cryobiology, 2020 Feb, 1;92:21-25
104. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Volumed Urban & Partner 2002 str. 436