

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Pupečnicková krev – vliv kryokonzervace a
demografických údajů matky a dítěte na jejím přihojení
při transplantacích**

Diplomová práce

Bc. Veronika Skladaná

Školitel: RNDr. Eva Matějková, PhD.

Fakultní garant: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2011

Skladaná, V., 2011: Pupečnicková krev – vliv kryokonzervace a demografických údajů matky a dítěte na jejím připojení při transplantaci. [Cord blood – influence of cryopreservation and demographic data of mother and child on engraftment for the transplantation. Mgr. Thesis, in Czech.] – 105 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The Master's thesis gives an overview of cord blood, its use, processing and cryopreservation. The role of cord blood as an alternative resource for transplantation is being widely discussed. In the experimental part, 50 grafts of donor cord blood were processed and the effect of cryopreservation and demographic factors of mother and child were evaluated on the cellularity of cord blood. Based on the evaluation, a recommendation about the inclusion of additional tests in routine processing of cord blood were made.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne

Veronika Skladaná

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat RNDr. Evě Matějkové, PhD. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této práce. Ráda bych poděkovala svým kolegyním Mgr. Petře Riebauerové a Monice Auerové, Dis. za velmi přátelskou atmosféru. Můj dík patří také mé rodině a příteli za velkou podporu.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Pupečnicková krev.....	2
2.1 Typy pupečnickové krve.....	2
2.2 Odběr pupečnickové krve.....	3
2.3 Zpracování a kryokonzervace pupečnickové krve.....	5
2.3.1 Měření objemu DPK.....	5
2.3.2 Odběr a archivace vzorků DPK.....	5
2.3.2.1 Testování dárcovské pupečnickové krve.....	6
2.3.3 Zpracování a kryokonzervace DPK.....	7
2.4 Skladování štěpů DPK.....	9
2.5 Zařazení DPK do registru.....	9
3. Použití pupečnickové krve.....	10
3.1 Kmenové buňky.....	10
3.1.1 Typy kmenových buněk.....	10
3.1.1.1 Rozdělení podle diferenciačního potenciálu.....	10
3.1.1.2 Rozdělení podle zdroje	11
3.2 Kmenové buňky pupečnickové krve.....	12
3.3 Hematopoetické kmenové buňky a jejich identifikace.....	13
3.4 CD34 ⁺ buňky.....	14
3.4.1 Průtoková cytometrie.....	14
3.5 Proč jsou kmenové buňky z pupečnickové krve tak cenné?.....	15
3.6 Transplantace krvetvorných buněk.....	16
3.7 Transplantace PK.....	17
3.7.1 Transplantace PK a její srovnání s transplantací BM.....	17
3.7.1.1 Prahové dávky jaderných buněk a CD34 ⁺ buněk a jejich vliv na výsledek transplantace PK.....	20
3.7.1.2 Vliv HLA na výsledek transplantace PK.....	21
3.7.2 Co-infuse MSC a dvojitá transplantace PK.....	22
3.7.2.1 Co-infuse MSC.....	22
3.7.2.2 Dvojitá transplantace PK.....	22
3.7.3 Využití PK v léčbě nemaligních chorob.....	23
3.7.4 Transplantace PK u dětí.....	24

3.7.5	Transplantace PK u dospělých.....	24
3.7.6	Výhody a nevýhody transplantace pupečnickové krve.....	25
4.	Banky pupečnickové krve.....	27
4.1	Banka PK v ČR.....	27
4.2	Mezinárodní spolupráce.....	28
4.3	Komerční banky PK.....	29
4.4	Etické problémy odběru a skladování PK.....	29
5.	Cíle diplomové práce.....	31
6.	Materiál a metody.....	32
6.1	Materiál.....	32
6.1.1	Pupečnicková krev.....	32
6.1.2	Spotřební materiál.....	32
6.1.3	Roztoky a reagenty.....	34
6.1.4	Přístroje.....	35
6.2	Metodika.....	35
6.2.1	Zpracování a kryokonzervace dárcovské pupečnickové krve.....	35
6.2.1.1	Zjištění objemu DPK.....	36
6.2.1.2	Odběr vzorku z DPK pro zjištění krevního obrazu (pro zjištění buněčnosti PK).....	36
6.2.1.3	Zpracování a kryokonzervace DPK.....	37
6.2.2	Transport zmražených vaků s DPK z laboratoře na kryobanku a uložení štěpů.....	41
6.2.3	Stanovení viability buněk fluorescenční metodou.....	42
6.2.4	Krátkodobá kultivace hematopoetických progenitorů (CFU-GM) z dárcovské pupečnickové krve po rozmražení.....	42
6.2.5	Flowcytometrická analýza PK před a po rozmražení.....	43
6.3	Optimalizace metody kultivace před zamražením.....	45
6.3.1	Krátkodobá kultivace hematopoetických progenitorů (CFU-GM) z dárcovské pupečnickové krve před zamražením.....	45
7.	Výsledky.....	52
7.1	Optimalizace – Kultivace pupečnickové krve před zamražením třemi metodami...52	
7.2	Měření exprese znaků CD34 ⁺ na živých leukocytech PK.....	54
7.3	Porovnání naměřených hodnot s demografickými údaji o matce a dítěti a vyvození hlavních trendů.....	55

7.3.1 Analýza podle věku matky.....	56
7.3.2 Analýza podle místa narození matky.....	58
7.3.3 Analýza podle krevní skupiny matky.....	62
7.3.4 Analýza podle doby, která uběhla mezi odběrem a zpracováním DPK.....	65
7.3.5 Analýza podle rozdílu mezi prvorodičkami a matkami s 1 a více dětmi.....	68
7.3.6 Analýza podle pohlaví dítěte.....	71
7.3.7 Analýza podle krevní skupiny dítěte.....	73
7.3.8 Analýza podle místa odběru PK.....	76
8. Diskuze.....	77
9. Závěr.....	85
10. Použitá literatura.....	87
11. Příloha 1 – Kontraindikace.....	92
12. Příloha 2 – Fotky.....	97
13. Příloha 3 – Výpočet vzorečku pro kultivaci před zamražením.....	102
14. Příloha 4 – Zdrojová data.....	103

Seznam použitých zkratek:

PK – Pupečnicková krev

PKT – Transplantace pupečnickové krve

DPK – Dárcovská pupečnicková krev

APK – Autologní pupečnicková krev

BM – Kostní dřeň

BMT – Transplantace kostní dřeně

PBSC – Periferní kmenové buňky

HSC – Hematopoetické kmenové buňky

HSCT – Transplantace hematopoetických kmenových buněk

GvHD – Reakce štěpu proti hostiteli

MSC – Mesenchymální stromální buňky

BPK-ČR – Banka pupečnickové krve České republiky

TRM – Mortalita po trasnplantaci

CFU – Colony forming units

DMSO – Dimethylsulfoxid

CFU-GM – Granulocyte-macrophage progenitor

BFU-E – Erythroid burst-forming unit

CFU-GEMM – Multipotential myeloid stem cell

FITC – Fluorescein isothiocyanate

PE – Phycoerythrin

MNC – Monocyty a lymfocyty

KS – Krevní skupina

1. Úvod

Komplikace s transplantováním kmenových buněk z kostní dřeně přivedly vědce k hledání jiného zdroje hematopoetických kmenových buněk. Jedním z takových zdrojů je právě pupečnicková krev, která je snadno dostupná a její získávání neinvazivní.

Pupečnicková krev představuje neomezený zdroj krvetvorných kmenových buněk pro alogenní i autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Od první zprávy o úspěšné transplantaci pupečnickové krve v roce 1988 významně vzrostl zájem o její využití jako alternativního zdroje kmenových buněk pro léčbu rakoviny a genetických chorob (Cornetta, K., Laughlin, M., et al., 2005).

Rozsáhlý výzkum za posledních 20 let stanovil bezpečnost a účinnost transplantací PK jak u dětí tak i u dospělých s různými maligními a nemaligními chorobami. Výzkum jasně prokázal, že tento zdroj kmenových buněk má několik unikátních charakteristik a nesporné výhody a nevýhody ve srovnání s transplantací nepříbuzenské HLA kompatibilní kostní dřeně nebo periferních kmenových buněk (Smith, A.R., Wagner, J.E., 2009).

Pupečnicková krev a placenta obsahují i vysoký počet nehematopoetických kmenových buněk, což vysvětluje rostoucí zájem o její použití pro rozvoj regenerativní medicíny (Gluckman, E., 2009).

Během posledních let se tak pupečnicková krev přesunula z postavení biologického odpadu na potenciálně významný zdroj krvetvorných kmenových buněk. V důsledku toho byly po celém světě zakládány banky pupečnickové krve pro sběr a kryokonzervaci PK.

Pupečnicková krev se dělí na dva základní typy – autologní a dárcovská. Tato práce se zabývá odběrem, zpracováním, kryokonzervací a uskladněním dárcovské PK.

2. Pupečnicková krev

Pupečnicková krev je krev, která zůstane v placentě a pupeční šňůře po narození dítěte. Tato krev byla spolu s placentou i pupeční šňůrou likvidována jako lékařský odpad. V posledních desetiletích však bylo zjištěno, že obsahuje velký počet mimořádně cenných kmenových buněk [38]. Ve vyspělých zemích světa se už po desetiletí shromažďují kmenové buňky PK pro vlastní použití (autologní PK) nebo pro společenské (solidární) použití (dárcovská PK), popř. je možné PK použít pro příbuzného jedince, v tomto případě hovoříme o příbuzenské PK.

2.1 Typy pupečnickové krve

Autologní pupečnicková krev

PK narozeného dítěte je uschována pro možné budoucí použití u daného dítěte. Na celém světě existuje mnoho soukromých bank PK, ve kterých je uloženo více než 1 milion těchto jednotek, ale jen zanedbatelný počet z nich byl použit pro transplantaci většinou s neznámými výsledky [1].

Příbuzenská pupečnicková krev

Buňky pocházející z kmenových buněk mohou být použity nejen u jejich „vlastníků“. Především přicházejí v úvahu příbuzní prvního stupně, čili rodiče, sourozenci a děti, protože existuje padesátiprocentní totožnost jejich „rodinných společných genů“. A navíc imunologická inkompatibilita nezralých kmenových buněk je menší v porovnání s buňkami, tkáněmi a orgány pocházejícími od dospělých osob [20, 31]. Příbuzenská PK je tak např. sbírána po porodu sourozence pacienta s onemocněním, které může být potenciálně léčeno transplantací PK. V těchto případech úvahy, jako jsou minimální sesbírané množství, redukce objemu nebo vyloučení z důvodu mikrobiální kontaminace, neplatí [1]. Je-li dostatečná shoda v tzv. tkáňových znacích mezi narozeným a nemocným dítětem, pak je možné transplantaci provést.

Dárcovská PK

Darování PK je bezplatné a anonymní. Pro odběr jsou nezbytné čtyři podmínky:

- vyplnit formulář se základními údaji (spolu s lékařem) a před darováním podepsat informovaný souhlas

- porod na jedné z uvedených klinik, které spolupracují s Bankou pupečnickové krve ČR, a to po bezproblémovém těhotenství
- klinické vyšetření miminka pediatrem při narození dítěte a v šesti měsících věku
- rozbor krve matky, a to především test na hepatitidu B a C, test na přítomnost viru HIV a test na syfilis [32]

2.2 Odběr pupečnickové krve

Odběr PK je jednoduchý proces, bezpečný pro matku i dítě. Nijak nezasahuje do průběhu porodu a matka jej může kdykoliv odmítnout. Odběr může být proveden po vaginálním porodu nebo po porodu císařským řezem [1, 33]. Nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly v objemu PK získané během vaginálního porodu (*in utero*, 72 ± 34 ml) nebo po císařském řezu (*ex utero*, 62 ± 19 ml) [2].

PK odebírá lékař nebo porodní sestra ihned po porodu dítěte v průběhu 3. doby porodní [20], ale ještě před porodem placenty. Odběr krve necítí ani matka, ani plod, neboť k odběru krve z pupečnicku dochází až poté, co byla pupeční šňůra od pupku plodu odstřižena.



Obrázek 1: Odběr PK do vaku s antikoagulačním roztokem

PK se odebírá do speciálních vaků s antikoagulačním roztokem, jejichž odváděcí hadička je zakončena jehlou, kterou porodník odebere krev z jedné silné žíly pupeční šňůry [34].



Obrázek 2: Odběrový vak s DPK, dvě srážlivé (bílé) a jedna nesrážlivá (červená) zkumavka

Odběr musí být rychlý, neboť PK se v placentě po přestřižení pupeční sňůry rychle sráží. Z placenty se také odebírají 2 ml srážlivé krve pro virologické vyšetření. Po porodu je ještě potřeba odebrat krev matce pro provedení testů na infekční markery. Vak s PK, zkumavky se srážlivou PK a s krví matky a všechny potřebné formuláře k odebranému štetpu se uskladní v lednici v jednom obalu a vše se odešle do zpracovávající laboratoře [34].

Důležitou podmínkou uchování je, aby byla krev odebrána sterilně. Vzhledem k tomu, že pupečník prochází porodními cestami bohatými na vaginální flóru, existuje reálné riziko kontaminace. Tomu lze zabránit důkladnou dezinfekcí pupečníku před odběrem, tím se riziko kontaminace sníží na minimum. Kontraindikací je například infekce HIV a aktivní hepatitida typu B a C [20]. Kompletní seznam kontraindikací je uveden v příloze 1 – Kontraindikace.

Průměrné množství krve odebrané z placenty se pohybuje kolem 90 ml [2], což je množství, které se hodí pro „bezpečnou“ transplantaci pacienta do 50kg, tedy většinou pouze pro dítě. Pro léčbu dospělého nemá tento objem v zásadě význam [6].

Ve všech odebraných vzorcích PK jsou přítomny mateřské buňky s frekvencí od 1 až do 100.000. Velmi nízký výskyt GvHD pozorovaný u příjemců transplantátu nepříbuzenské DPK však naznačuje, že pečlivě sbírané pupečnickové krve mají buď příliš malou kontaminaci mateřskými T buňkami, která není klinicky významná, nebo mateřské T buňky nejsou imunologicky aktivní v tomto kontextu [2]. Je prokázáno, že hematopoetické kmenové buňky z pupečnickové krve nejsou imunologicky vyzrálé a tedy nejsou schopny vyvolat závažnější typy GvHD.

2.3 Odběr vzorků a zpracování dárcovské pupečnickové krve

V současnosti se používá několik metod zpracování PK založených na kryokonzervaci, která je prováděna na automatických přístrojích řízených počítačem [20].

Před zpracováním je potřeba získat souhlas matky dítěte s odběrem PK, dále pro sběr vzorků, zpracování a zmrazení PK, pro otestování matky i dítěte na infekční onemocnění a pro skladování vzorků mateřské a pupečnickové krve. Dále musí být k dispozici detailní lékařská anamnéza matky dítěte. Jsou zde přísná kritéria (nároky na objem, buněčnost, anamnézu a další), která musí být splněna, jinak nebude odebraná PK zpracovaná [3].

V prvních letech sběru a skladování PK nebylo jasné, zda má časový interval mezi odběrem a zpracováním vliv na kvalitu kmenových buněk. Současné standardy NetCord-Fact (4. vydání) ukazují, že všechny PK jednotky by měly být zpracovány do 24 hodin po odběru, a to buď uzavřeným systémem nebo v kontrolované čisté místnosti [1]. Vědecky bylo zjištěno, že v prvních 48 hodinách přežívají všechny kmenové buňky, za 72 hodin odumírá 5% buněk, za 96 hodin 10% buněk, po 96 hodinách se odumírání kmenových buněk výrazně zrychluje a navíc se pravděpodobně mění charakter těchto buněk [4].

2.3.1 Měření objemu DPK

U PK dopravené z porodnice do laboratoře se nejprve zjistí její objem. Malé objemy (pod 60 ml) se nezpracovávají, protože ve štěpu není dostatečné množství buněk. Další zpracování pak probíhá v laminárním boxu, pokud jde o otevřený systém, nebo v místnosti s čistotou třídy C za použití uzavřeného systému zpracování.

2.3.2 Odběr a archivace vzorků DPK

Důležitým krokem je odběr vzorků ze štěpu. Před zmrazením se z PK odebírají vzorky na zjištění krevní skupiny, vitality, na krevní obraz, virologické (serologické) a bakteriologické vyšetření a vzorky na HLA typizaci [3]. Archivace vzorků je zásadní, aby bylo možné provést další testy v budoucnu, kdy je jednotka vybraná pro transplantaci.

Z hodnoty WBC (počet leukocytů) krevního obrazu se zjišťuje **buněčnost** štěpu. Pokud je hodnota nižší než $80 \times 10^7/\text{ml}$, PK se likviduje. Asi polovina přijatých PK se nezpracuje

právě kvůli nízkému objemu nebo malé buněčnosti. Stejně tak se vyřazují vzorky s pozitivním serologickým vyšetřením.

2.3.2.1 Testování dárcovské pupečnickové krve

Před zpracováním a uskladněním PK musí být provedeno několik testů.

Krev od matky a PK jsou testovány na markery nakažlivých chorob, včetně testů na syfilis, lidský T-buněčný lymfotropní virus typu 1 (HTLV-1), HIV, hepatitidu B a C a na cytomegalovirus (CMV) [3]. V některých zemích jsou důležitá i další vyšetření, jako jsou testy na malárii, Chagasovu chorobu, Západonilskou horečku a syndrom akutního respiračního selhání (SARS). PK musí být také otestována na markery těchto chorob, jakmile je rezervována nebo vybraná pro transplantaci [1].

Zpracovávaná jednotka je také testována na aerobní a anaerobní kultury ke zjištění přítomnosti bakterií nebo plísňové kontaminace z porodních cest. Podle současných standardů bakteriálně kontaminované jednotky PK musí být zlikvidovány. Výjimku tvoří pupečnickové krve sbírané pro cílené použití, a to buď příbuzenské nebo autologní, které mohou být uloženy i za předpokladu, že je PK kontaminovaná [1].

Následně se provádí ABO/Rh a HLA typizace PK. Aktuální normy vyžadují, aby všechny HLA typizace byly provedeny za použití molekulárních metod. Vzorky na HLA se odebírají pro zjištění imunitních znaků na povrchu buněk, což je zásadní pro použití štěpu k transplantaci [35].

Dále se zjišťuje počet jaderných buněk ve štěpu PK před a po zpracování [3]. Před samotným zamražením se ještě odebere přibližně 5 ml PK smíchané s DMSO a rozdělí se po 1 ml do kryotub, neboť část vyšetření se dělá z rozmražených vzorků. Takto se například zjistí, jaké budou buněčné hodnoty po rozmražení celého štěpu při transplantaci. Pro tento typ vyšetření je třeba kultivovat malý vzorek PK ve speciálním médiu podporujícím množení hematopoetických progenitorů. Tyto progenitory tvoří tzv. Colony forming units (CFU) a to již po 14denní kultivaci PK v CO₂ termostatu. Podle typů a počtu těchto CFU lze zjistit, jak velká je schopnost progenitorů hematopoetických buněk rozmnožovat se. Z rozmraženého vzorku se také určuje množství CD34⁺ buněk ve štěpu pomocí flow cytometru (viz 3.4.1). Potřeba testování počtu CD34⁺ buněk vznikla v návaznosti na popis některých transplantačních center, kde množství CD34⁺ buněk lépe korelovalo s přihojením štěpu než

celková dávka jaderných buněk. Pokud nějaký ze zmrazených štěpů nevyhovuje náročným požadavkům, je vyřazen. Daný štěp DPK je zlikvidován jako biologický odpad nebo může být použit pro vědecké účely. Údaje o něm se do světového registru nedostávají.

Matka a dítě musí být opět kontrolováni za 6 měsíců po porodu, kdy jsou opakovaně provedeny testy na infekční nemoci a je pořízen nový lékařský záznam [3].

2.3.3 Zpracování a kryokonzervace DPK

PK se po odebrání vzorků přepustí z odběrového vaku do kryovaku (vaku dobře snášejícího nízké teploty) a doplní se speciálním roztokem s DMSO (dimethylsulfoxid). DMSO je pronikající nebo-li intracelulární kryoprotektivum, v současnosti nejpoužívanější a nejúčinnější, používané obvykle v 5% nebo 10% koncentraci, a to buď samostatně nebo v kombinaci s extracelulárními kryoprotektivy, kam patří makromolekulární látky, např. dextran nebo hydroxyetylškrob. DMSO zabraňuje poškození buněk při zamražení, neboť brání tvorbě ledových krystalků v buňce, které by ji jinak potrhaly. Buňka tak zmrzne najednou, jako jeden celek. Nároky na kryoprotekci jsou velmi vysoké, neboť krvetvorné buňky získané z PK je nutno konzervovat a skladovat takovým způsobem, aby byly použitelné pro autologní nebo alogenní transplantaci po letech až desetiletích [13].

Nakonec se vak zataví, umístí se mezi dvě desky, čímž se zajistí, aby se PK rovnoměrně rozprostřela po celém objemu kryovaku. Tímto způsobem se vyloučí rozdíly v rychlostech zmrazování a tání mezi centrem a periferií zmrazovaného vzorku. Požadovaná rychlost zmrazování je zajišťována použitím programovatelného zmrazovacího zařízení [13]. Po zmrazení se vaky přemístí do kontejneru s párami tekutého dusíku. Veškerá manipulace se vzorky PK probíhá za dodržování nejpřísnějších pravidel sterility.



Obrázek 3: Programovatelné zmrazovací zařízení se zásobníkem LN²

Zpracování velkých objemů PK

Pokud je objem odebrané PK příliš velký je potřeba provést jeho redukci. Většina redukčních metod ochuzuje jednotky PK o červené krvinky a plazmu a zanechávají buffy coat (směs leukocytů a trombocytů) ve standardním objemu při zachování kvality a kvantity sesbíraných kmenových buněk. Důležitým hlediskem pro výběr redukční metody je, aby byl zachován maximální počet jaderných buněk a CD34⁺ buněk uložených ve vrstvě buffy coat [1].

Metody určené k redukci objemu pupečnickové krve mohou být tyto:

- sedimentace červených krvinek s použitím hydroethylového škrobu nebo jiných koloidních látek
- separace buffy coat (vrstva mononukleárních bílých krvinek vznikají na rozhraní mezi vrstvou červených krvinek a plazmy) [4]

Při provedení redukce objemu je nutné vyšetřit úplný krevní obraz jaderných buněk, erytrocytů a CD34 buněk a to před i po zpracování, aby bylo možné posoudit vliv manipulace na životaschopnost a kvalitu jednotky PK před jejím dlouhodobým skladováním. Významnou výhodou snížení objemu je, že se tak snižuje množství DMSO obsaženého v jednotce PK, což je výhodné zejména u jednotek, které budou podány malým dětem. Zpočátku, vzhledem k velkému objemu DMSO, musely být buňky PK před podáním promyty, a to hlavně v případě malých dětí. V současné době se promývání díky nižším objemům jednotek nevyžaduje [1].

2.4 Skladování štěpů DPK

Transplantáty musí být uskladněny tak, aby se v průběhu desetiletí skladování nepoškodily. Uchovávají se ve speciálních krabičkách s popiskem (kód DPK, zamražený objem PK, datum porodu a pozice ve vestavbě daného kontejneru). Krabičky s DPK se umísťují do speciálních vestaveb (pro usnadnění hledání vaků DPK) v biologických kontejnerech s tekutým dusíkem při teplotě -196°C nebo v jeho parách (obr. 20) [20]. Kontejnery jsou umístěny v samostatné místnosti, tzv. **kryobance**, a jsou vakuovým potrubím napojeny na externí zásobník tekutého dusíku se systémem automatického plnění kontejnerů ze zásobníku při poklesu hladiny pod určitou hranici. Parametry skladovacích kontejnerů (hladina, teplota, plnění, otevření víka) jsou kontinuálně monitorovány a zaznamenávány, stejně jako prostředí v místnosti kontejnerů (obsah kyslíku ve vzduchu, vlhkost, teplota při podlaze a 150cm nad podlahou). Pro případ výpadku elektrického proudu je kryobanka vybavena záložním zdrojem elektrického proudu [20].

Nejprve jsou štěpy PK uloženy v karanténě (v parách dusíku) a až po vyšetření na infekční choroby mohou být umístěny do příslušných pozic v tekutém dusíku mezi další transplantáty. V kryobance mohou štěpy čekat na použití i desítky let. V současné době je garantovaná úschova kmenových buněk na 20 let.

Zkušenosti z kultur kmenových buněk však ukazují, že úspěšné skladování při teplotě tekutého dusíku je časově neomezené.

2.5 Zařazení DPK do registru

Jakmile je dokončeno zpracování PK a jsou k dispozici výsledky testů, musí být všechny informace týkající se matky a PK přezkoumány lékařem k posouzení vhodnosti jednotky pro zařazení do banky PK. Pokud jsou jednotky lékařsky uvolněné, mohou být zařazeny do národního a mezinárodního registru dárců. Všechny PK jsou registrovány pod jedinečným kódem s následujícími informacemi: výsledek HLA typizace, objem PK a množství jaderných buněk konečného produktu. Otázka, zda by počet CD34^+ buněk měl být zahrnut v registraci, je v současné době předmětem diskuzí [1].

Pokud nějaký ze zmrazených štěpů nevyhovuje náročným požadavkům, je vyřazen a údaje o něm se do světového registru nedostávají.

3. Použití pupečnickové krve

Pupečnicková krev je v současné době odebírána a uskladňována především jako rezervoár hematopoetických kmenových buněk. Obsahuje však i variabilní množství (0,1 – 5%) mezenchymálních kmenových buněk.

3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nezralé buňky v těle, které představují základní stavební kameny orgánů, tkání, krve a imunitního systému [17]. Tyto buňky mají schopnost sebeobnovy (produkovat kopie sebe samých), mohou se neomezeně dělit nebo diferencovat do různých specializovaných buněčných typů např. na buňky svalů, sliznic, vnitřních orgánů, kuže apod. Z vývojového hlediska jde o nejstarší buněčné elementy [17, 36].

První kmenová buňka vzniká po splynutí vajíčka se spermii a rychle se začne dělit. Zárodečná buňka je tzv. **totipotentní**, tzn. musí z ní vzniknout všechny buňky v těle [30].

Kmenové buňky se mohou dělit nejen symetricky, ale též asymetricky, kdy jedna dceřiná buňka si zachová charakter původní kmenové buňky, kdežto druhá se stává rychle proliferujícím progenitorem se schopností diferenciace až na terminální zralou buňku příslušné tkáně (orgánu). Progenitorová buňka má omezený počet dělení, pak se diferencuje nebo zanikne [21].

Kmenové buňky jsou přítomny i v dospělém organismu, například v kostní dřeni, ale musí dojít k jejich diferenciaci, aby vznikly specializované buňky např. buňky krevní řady, ale i srdeční, svalové nebo mozkové [17, 30].

3.1.1 Typy kmenových buněk

3.1.1.1 Rozdělení podle diferenciačního potenciálu

Z hlediska diferenciačního potenciálu dělíme kmenové buňky na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. **Totipotentní kmenové buňky** neboli omnipotentní mohou dát vznik všem buňkám jedince – tedy buňkám embryonálních i extraembryonálních tkání, ale také další totipotentní buňce. Mají schopnost diferencovat se v buňky nejrůznějších tkání a orgánů, v jejichž prostředí se právě nachází. Totipotentní kmenová buňka, ať už je odkudkoliv odebrána, se např. po umístění mezi buňky srdečního svaly diferencuje v další srdeční buňku [37].

Pluripotentní kmenové buňky jsou potomci totipotentních buněk, kteří mohou produkovat jakékoli jiné buňky kromě buněk totipotentních. Mohou dát vznik všem buňkám budoucího jedince. Jejich charakteristickou vlastností je tvořit buňky všech tří zárodečných listů (tj. ektodermu, entodermu a mezodermu). **Multipotentní kmenové buňky** se mohou diferencovat do mnoha typů buněk, ale pouze v rámci daného typu tkáně – např. z hematopoetické kmenové buňky vznikají všechny buňky krevní řady, ale za běžných podmínek z ní nevznikne buňka nervová. **Unipotentní kmenové buňky** neboli **buňky progenitorové** dávají vzniknout jednomu buněčnému typu a zároveň mají zachovanou schopnost sebeobnovy, čímž se liší od buněk, které kmenové nejsou. Tyto buňky tvoří přechodné stadium mezi buňkami kmenovými a zralými, specializovanými buňkami [17, 37].

3.1.1.2 Rozdělení podle zdroje

Existují čtyři základní zdroje zárodečných buněk:

1. **Embryonální buňky** – vznikají při prvních děleních oplozeného vajíčka (zygoty), tj. ve fázi blastocysty. Získávají se z vnitřních buněk embrya. I po několika měsících v kultuře si uchovávají schopnost vytvořit jakýkoliv buněčný typ. Problémem jejich využití je malý počet a etické a právní otázky. Jedná se o omnipotentní buňky [21, 30].
2. **Fetální buňky** – nacházejí se v orgánech vyvíjejícího se plodu. Jsou zodpovědné za vývoj všech tkání a orgánů až po narození. Tyto buňky jsou již více nasměrovány. Fetální buňky se využívají např. k léčbě Parkinsonovy choroby [30].
3. **Adultní (somatické) kmenové buňky** – nachází se ve specializovaných tkáních jedince, např. v kostní dřeni, srdci, sítnici, mozku, ve střevě nebo v kůži. Jedná se o multipotentní kmenové buňky, které mají užší diferenciační potenciál; různé typy těchto kmenových buněk proliferují a diferencují různě. Adultní kmenová buňka je determinovaná orgánem (tkání), z kterého pochází. Má dlouhodobý replikační potenciál, schopnost jak samoobnovy tak diferenciaci až na zralou buňku příslušného orgánu a vysokou plasticitu. Tyto vlastnosti jim umožňují vytvářet různé progenitory zralých buněk a účastnit se tak aktivně na udržování homeostázy doplňováním buněk, které do určité míry obnovují tkáně a orgány „opotřebované“ a nebo poškozené v průběhu života jedince [17, 21]. Adultní kmenové buňky jsou v klidovém stádiu, ale připraveny na podnět, který navodí regeneraci určité tkáně.

V příslušné tkáni se kmenové buňky vyskytují na místech, které označujeme jako *niches*. (viz 3.3).

4. **Buňky pupečnickové krve** – představují také možný zdroj kvalitních kmenových buněk, ale v PK je jich poměrně málo. Zatím je využití PK v klinické medicíně spojeno především s transplantací krvetvorných buněk při různých onemocněních krvetvorné tkáně, zejména u dětí. Pravděpodobnost využití uskladněné PK pro vlastní potřebu nebo potřebu sourozenců je v současné době poměrně malá, ale s výhledem na pokroky v regenerativní medicíně se může jednat o zajímavý zdroj autologních kmenových buněk [14, 30].

3.2 Kmenové buňky pupečnickové krve

Kmenové buňky novorozence lze nalézt v PK a v samotné pupeční šňůře. PK je zdrojem hematopoetických kmenových buněk, které tvoří krev a imunitní systém. Pupečnicková tkáň je zase bohatým zdrojem mezenchymálních kmenových buněk, které tvoří strukturální a pojivové tkáně [15, 38].

Krevní kmenové buňky PK jsou odlišné od jiných kmenových buněk. Jednak jsou biologicky mladší a mají unikátní vlastnosti a výhody ve srovnání s jinými zdroji kmenových buněk (viz 3.5). V porovnání s kostní dření vykazují vysoký migrační potenciál a větší kapacitu pro sebeobnovu a dlouhodobou kultivaci. Buňky PK nejsou embryonální kmenové buňky a nejsou tak kontroverzním tématem [39].

PK pochází z nezralého organismu, její buňky jsou tudíž také imunitně nezralé, takže se vyznačují menší reakcí štěpu proti hostiteli (GvHD) [28]. Přihodují se však nejdéle, což souvisí i s tím, že takto získaných buněk je málo. Některé studie ukazují, že snížený výskyt GvHD může být způsoben tím, že buňky PK produkují zvýšené množství anti-zanětlivého cytokinu – interleukinu 10 [5].

Hematopoetické kmenové buňky a mezenchymální stromální buňky obsažené v PK jsou multipotentní a představují tak významný zdroj zejména pro buněčnou terapii a tkáňové inženýrství. Výzkum ukazuje, že kromě krvetvorných buněk jsou kmenové buňky z placentární krve schopny diferencovat na buňky produkující inzulin, specifické buňky mozku, buňky srdečního svalu a jiné. V současnosti se však v praxi využívají hlavně hematopoetické kmenové buňky [38].

3.3 Hematopoetické kmenové buňky a jejich identifikace

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou kmenové buňky mezoderálního původu, které mají schopnost sebeobnovy. U dospělého člověka se nachází hlavně v kostní dřeni. Z těchto buněk se v procesu **hematopoézy** neboli krvetvorby tvoří podle aktuální potřeby organismu funkční krevní a imunitní buňky [15, 19]. Z HSC tak vznikají červené krvinky, krevní destičky a různé bílé krvinky. U dospělého jedince probíhá hematopoéza nejprve v kostní dřeni všech kostí, později především v dřeni obratlů a hrudní kosti. Stejně jako ostatní kmenové buňky se HSC vyvinuly z tzv. embryonálních kmenových buněk [17, 40].

HSC se v dospělém organismu nachází hlavně v kostní dřeni, v místech nazvaných **niches** (ložiska, útluky kmenových buněk). Tato ložiska se skládají z různých buněk stromatu, z hematopoetických buněk, progenitorových buněk, zrajících krevních buněk a kapilárního řečiště [6]. Niches slouží pro výživu kmenových buněk, udržují je v klidovém stavu a zajišťují specifické mikroprostředí poskytující signály potřebné pro regulaci hematopoézy, sebeobnovy, diferenciaci a také pro regulaci buněčného cyklu HSC [21, 15].

Kromě kostní dřene se HSC nachází i jinde v lidském těle. Jsou schopny migrovat z kostní dřene do periferní krve a naopak. Počet migrujících HSC lze zvýšit stimulací cytokiny, čehož se využívá pro získání štěpu k transplantaci. HSC se nachází také v PK a i tyto buňky lze použít k transplantaci [15].

HSC zůstávají v klidovém stádiu, dokud nejsou vnějším signálem stimulovány ke vstupu do buněčného cyklu. V tomto klidovém stádiu je označujeme jako tzv. LT-HSC (long-term HSC), protože jsou schopné dlouhodobé obnovy hematopoézy u jedince, který má ozářením zničenou vlastní hematopoézu [17]. Zatímco ostatní buňky jsou schopné obnovit produkci všech krevních buněk na několik měsíců, nikoli dlouhodobě. Jedná se o tzv. ST-HSC (short-term HSC), které vznikají diferenciací z LT-HSC. Jsou to progenitory, které mají kapacitu proliferovat, ale nikoliv schopnost sebeobnovy [17, 15]. Dalším dělením z těchto buněk vznikají lymfoidní a myeloidní progenitory. Myeloidní progenitor dává vzniknout granulocytům (eosinofilům, bazofilům, neutrofilům), monocytům, makrofágům a dendritickým buňkám, žírným buňkám, megakaryocytům a erytrocytům. Z lymfoidního progenitoru vznikají B a T lymfocyty a všechny jejich podskupiny, a dále NK buňky [19, 40].

3.4 CD 34⁺ buňky

Vyzárající krvetvorné buňky jsou charakterizovány různými povrchovými antigeny, tzv. diferenciacními skupinami (CD). Povrchové markery, specifické pro jednotlivé podskupiny HSC, jsou využívány především pro jejich izolaci (separaci) z kostní dřeně a periferní krve. Tyto markery můžeme využít při pozitivní i negativní selekci.

Jedná se především o antigen CD34 o molekulové hmotnosti 115 kDa. CD34 je znám jako marker hematopoetických progenitorových buněk, který je nejpoužívanějším markerem k získání obohacených populací lidských HSC a progenitorů pro výzkum i klinické využití. Jak tyto buňky maturují a diferencují, exprese CD34 se vytrácí [41].

CD34 je transmembránový glykoprotein, který se podílí na adhezivní funkci buňky. Nachází se na povrchu 1-4% buněk kostní dřeně. V periferní krvi se nachází u 0,01% buněk z celkového počtu jaderných buněk [13]. K zvýšení jejich počtu nad 1% dochází při aplikaci cytokinů nebo cytotoxické léčbě. Toho se využívá k získání HSC z periferní krve pro klinické transplantace [19]. CD34⁺ progenitory jsou dostupné nejen z kostní dřeně a mobilizované periferní krve, ale také z PK a fetálních jater. CD34⁺ buňky jsou schopné iniciace dlouhodobé hematopoézy jak *in vitro* tak *in vivo* a vykazují velkou proliferační aktivitu a rychlou obnovu krvetvorby po transplantaci [41].

Tyto buňky se nejčastěji získávají metodou průtokové cytometrie, tzv. FACS (fluorescence-activated cell sorting) nebo pomocí imunomagnetické separace.

3.4.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometrie) je metoda určená pro rychlou analýzu značených částic nebo buněk, které procházejí snímacím místem (laserovým paprskem). Pro značení vzorků se používají monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy. *Fluorochromy* (fluorescenční barviva vážící se na nukleové kyseliny či jiné součásti buněk) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla avšak již o odlišné vlnové délce. Nejčastěji používané flourochromy jsou FITC (fluorescein isothiocyanate), který má absorpční maximum při vlnové délce 490 až 495 nm a emituje světlo o vlnové délce 520 nm v zelené oblasti a PE (phycoerythrin) s absorpčním maximem při vlnových délkách 485 až 575 nm. PE emituje světlo o vlnové délce 575 nm v červené oblasti [46, 47].

Průtokové cytometry se skládají ze systému fluidního, optického a elektronického. Pomocí fluidního systému jsou buňky obaleny pláštěm nosné tekutiny (PBS, komerční tekutiny jako FACSFlow, Unisol) a pod tlakem hnány do speciálního prostoru (flow chamber), kde dochází ke křížení dráhy paprsku monochromatického laseru procházejícího buňkou .

Optický systém sestává z části excitační tvořené laserem a soustavou čoček a hranolů usměrňujících světelný paprsek a části sběrné. Sběrná část optiky se sestává z optických zrcadel a filtrů umožňujících detekci světelných kvant specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory.

System elektronický pak převádí optický signál na elektrický a zároveň jej digitalizuje pro počítačovou analýzu. Data všech parametrů měřených na individuální buňce jsou shromážděna a uchována jako datový soubor, tzv. "list mode file", který je připraven k následné analýze [47]

U každé buňky jsou zaznamenávány dva optické parametry, odražené světlo (závisí na granularitě částice) detekuje Side scatter (SSc) a rozptýlené světlo (závisí na velikosti částice) detekuje Forward scatter (FSc), a další nejméně dva parametry intenzity fluorescence (míry excitace). Každá částice nebo buňka je snímána zvlášť, proto jsou výsledky měření velmi přesné [45].

Ke grafickému zobrazení se nejčastěji používá dot-plot histogram (dvourozměrný graf), kde je na ose x vynesena intenzita jednoho a na ose y intenzita druhého signálu a každá buňka je zobrazena jako tečka. Výsledná data mohou být rovněž zobrazena v trojrozměrném izometrickém grafu nebo ve formě histogramu pro každý jednotlivý parametr [47].

Nevýhodou flow cytometrie je limitované množství zpracovaných buněk [15].

3.5 Proč jsou kmenové buňky z pupečnickové krve tak cenné?

Je více příčin, kvůli kterým je použití kmenových buněk z pupečnickové krve výhodnější, než tradiční zdroj kmenových buněk, kterým je kostní dřev člověka.

- Transplantované buňky z PK si po transplantaci s velkou pravděpodobností zachovají svoji životaschopnost.
- V porovnání se vzorky BM (kostní dřev) jsou mnohem méně citlivé na odchylky imunitního typu přijímajícího organismu.

- Produkují méně protilátek vůči přijímajícímu organismu, než buňky BM. Existuje mimořádně malé riziko virové nákazy vzorku.
- Kmenové buňky z PK se nedostaly do styku s takovými nemocemi, s jakými se BM z dospělého organismu již setkala.
- Nejvýznamnější předností však je, že se vlastní kmenové buňky novorozence, od kterého byl vzorek odebrán, dokonale přizpůsobí původnímu organismu, ať již k jejich transplantaci dojde v jakémkoli věku. U sourozenců můžeme ve čtvrtině případů počítat s tím, že se kmenové buňky budou dokonale shodovat [11].

3.6 Transplantace krvetvorných buněk

Transplantace krvetvorných buněk spočívá v eliminaci vlastní hematopoézy pacienta a jejím znovuoobnovení pomocí zdravých krvetvorných buněk dárce. HSC můžeme získat ze tří zdrojů: kostní dřeň, z periferní krve a pupečnickové krve. Každý zdroj má svá specifika [11].

Existují čtyři typy transplantací:

- **Autologní** – dárce je pacient sám sobě. HSCs jsou pacientovi odebrány a uschovány v době, kdy nemá projevy onemocnění (v remisi). Při onemocnění pacient podstoupí razantní léčbu, která zároveň zlikviduje jeho kostní dřeň. Krvetvorba je mu navržena pomocí jeho vlastního štěpu [20]. V takto získaném štěpu však mohou být i nádorové (leukemické) buňky, které jsou pravděpodobně příčinou častých relapsů onemocnění po autologní transplantaci. Dodnes se žádné výzkumné skupině nepodařilo najít způsob, jak tyto buňky ve štěpu zlikvidovat [15]. Jde o nejčastější druh transplantace s nejmenšími potransplantačními komplikacemi oproti ostatním transplantacím, neboť na rozdíl od transplantátu od jiné osoby je zde menší riziko tkáňové neshody.
- **Alogenní příbuzenská** – dárce je to v tomto případě někdo z rodiny – je nejčastějším typem alogenních transplantací, její výhodou je větší imunologická vhodnost. Nutná je HLA typizace. Sourozenecká transplantace u BM se ukáže jako vhodná přibližně ve 25%, u PK asi ve 35% [20].
- **Alogenní nepříbuzenská** – dárce je v tomto případě anonymní získaný z registru dárců BM nebo z banky PK. Transplantace bývá provázena množstvím komplikací, ale pro mnoho pacientů je to jediná šance [20]. Samozřejmě je nutná HLA typizace. Mezinárodní registr dárců kostní dřeň eviduje asi 8 miliónů dobrovolných dárců [2] a registry pupečnickové krve asi 150 000 darovaných potenciálních transplantátů. Šance,

že mezi nimi bude kompatibilní dárce nebo transplantát je asi 50% [20]. Úspěšnost alogenní transplantace závisí na mnoha faktorech – věk pacienta, čas uplynulý od diagnózy, fáze nemoci, pohlaví a shodnost dárce [15].

- **Xenogenní** – transplantace z jednoho živočišného druhu na jiný. U krvetvorné tkáně se u člověka nepoužívá [13].

3.7 Transplantace PK

Do dnes bylo na celém světě provedeno více než 4 000 nepříbuzenských transplantací PK [5]. První transplantace PK byla s úspěchem provedena ve Francii v roce 1988 u dítěte s Fanconio anémií. K transplantaci byla použita PK od jeho zdravé, HLA identické sestry. Tento první úspěch vydláždil cestu pro úplně nové pole v oblasti alogenní HSCT (transplantace hematopoetických kmenových buněk) [6]. PKT (transplantace pupečnickové krve) se začala v posledních letech čím dál víc uplatňovat při doplňování kostní dřeně, v léčbě srpkovité anémie a thalasemie, k léčbě pacientů se závažnými nebo recidivujícími hematologickými malignitami, syndromy selhání kostní dřeně, dědičnými stavy imunodeficiencie a vrozenými metabolickými poruchami (viz 3.7.3) [11, 7].

Výsledky transplantací PK u pacientů s hematologickými malignitami (u dětí i dospělých) se zlepšily v průběhu posledních let v důsledku vyššího počtu všech jaderných buněk ve štěpech PK, nižšího počtu rozdílů HLA, transplantací na začátku nebo ve střední fázi onemocnění a samozřejmě i dalšími faktory, jako je podpůrná péče (lepší kontrola infekcí a léčba) a zkušenosti centra [16, 22].

3.7.1 Transplantace PK a její srovnání s transplantací BM

Řada studií dokazuje, že transplantace hematopoetických buněk z PK je jiná v mnoha ohledech ve srovnání s více tradičními zdroji hematopoetických buněk – BM a PBSC (periferní kmenové buňky) [15].

Uchycení štěpu

V porovnání s BMT (transplantace kostní dřeně) je transplantace PK spojena s časovou prodlevou uchycení štěpu granulocytů a trombocytů [24]. Ve většině zpráv se uvádí průměrná

doba pro obnovu neutrofilů v rozmezí mezi 20 – 30 dny a pro obnovu destiček 72 – 86 dní. Uchycení štěpu, rychlost obnovy a engraftment neutrofilů a destiček jsou spojeny s počtem jaderných buněk, CD34⁺ buněk a s počtem rozdílů v HLA [16, 23].

Akutní a chronická GvHD

Úspěšné využití HSC transplantační léčby (BM a PBSC) je limitováno nedostatkem HLA kompatibilních dárců a vysokým rizikem GvHD po transplantaci [16, 7]. Akutní reakce štěpu proti hostiteli je jedním z prvních problémů po alogenní transplantaci BM a je částečně vyvolána uvolněním cytokinů [3]. Proto je rozumné předpokládat, a výsledky transplantací to potvrzují, že PKT, navzdory rozdílům v HLA, indukuje méně často a méně závažné akutní a chronické GvHD než transplantace hematopoetických buněk od dospělého jedince, která obsahuje vyšší počet aktivovaných T buněk [22, 27].

TRM (mortalita po transplantaci)

TRM je hlavní překážkou úspěšného výsledku transplantace u příjemců nepříbuzenské dárcovské BMT a je důvodem pro využití PK jako alternativního zdroje HSC.

Výskyt TRM po PKT je nižší než po BMT. TRM je spojena s dávkou CD34⁺ buněk, vývojem III-IV stupně akutní GvHD a s věkem pacienta.

Nebyla zaznamenána žádná spojitost s HLA, pohlavím, rasou, hmotností, ABO inkompatibilitou, ani s diagnózou (malignita vs nemalignita). Stejně jako u nepříbuzenské dárcovské BMT byla nejčastější příčinou úmrtí po transplantaci PK infekce a relaps onemocnění. Riziko infekce je pravděpodobně spojeno s prodlouženou délkou neutropenie u příjemců nižších buněčných dávek [7].

Relaps

Recidiva onemocnění není ovlivněna buněčnou dávkou, HLA shodou, ani výskytem akutní nebo chronické GvHD. Relaps byl spojen pouze s věkem příjemce a se závažností maligního onemocnění [23].

Přežití

Celkové přežití souvisí s věkem příjemce PK, typem onemocnění, dávkou CD34⁺ buněk, HLA shodou a s vývojem III a IV stupně akutní GvHD [23, 3]. Potenciálně rizikové faktory, jako CMV (cytomegalovirus) serologický status příjemce, hmotnost příjemce, pohlaví, rasa, ABO shoda a závažnost maligního onemocnění, nesouvisí s přežitím po PKT.

Příznivé výsledky jsou tedy u mladších pacientů s nemaligní diagnózou, kteří dostali štěp s větším počtem buněk CD34⁺ / kg a nedošlo u nich k těžké GvHD.

Celkové přežití bez nemoci je podobné mezi oběma skupinami [3].

Další faktory ovlivňující výsledek transplantace PK

Řada dalších aspektů spojených s výběrem jednotky PK a transplantací může ovlivňovat výsledek PKT. Nicméně publikované údaje jsou stále ještě předběžné a potřebují potvrzení u větší řady pacientů. Mezi tyto faktory patří například *ABO inkompatibilita*, která je spojena s nižším přežitím u dospělých pacientů s hematologickými malignitami. Proto by mělo být bráno v úvahu při PKT u dospělých použití jednotky, která je ABO kompatibilní nebo s drobnými rozdíly.

Dalším faktorem je *vliv skladování na jednotku* a její vliv na výsledky PKT. Některé banky v USA a v Evropě byly založeny na počátku roku 1990, 'stáří' uložených jednotek PK je tedy kolem 20 let. Zatím nebyly publikovány žádné údaje, které by ukazovaly vliv skladování na výsledky [8].

Výsledky dosavadních studií PKT lze shrnout následovně:

- I nadále zůstává zlatým standardem pro transplantaci kostní dřeň.
- PK je využívána u pacientů, pro které neexistuje vhodný dárce BM [9].
- Transplantace PK:
 - rekonstruuje krvetvorbu a dosáhne udržitelného přihojení, ale se zpožděnou myeloidní obnovou,
 - je spojena s nízkou incidencí reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) [22],
 - nemá za následek vyšší riziko relapsu a má podobnou míru přežití jako jiné zdroje alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk.

3.7.1.1 *Prahové dávky jaderných buněk a CD34⁺ buněk a jejich vliv na výsledek transplantace PK*

Buněčná dávka je nejdůležitějším a limitujícím faktorem ovlivňujícím výsledek transplantace. Může být vyjádřena buď jako počet všech jaderných buněk nebo počet CD34⁺ buněk ve štěpu na kilogram tělesné hmotnosti příjemce. Tato dávka koreluje s uchycením štěpu, četností výskytu nežádoucích potransplantačních reakcí, mortalitou a s přežitím pacienta [8, 9]. Dávka buněk významně ovlivňuje rychlost a výskyt hematopoetické obnovy po transplantaci PK. Vyšší počet buněk tak zajišťuje lepší výsledek [6].

Minimální počet jaderných buněk by měl být $3 \times 10^7/\text{kg}$ nebo CD34⁺ buněk $2 \times 10^5/\text{kg}$ [1]. Dávka buněk nižší než výše uvedená snižuje pravděpodobnost přijetí a přežití. Počet buněk, které mají být obsaženy v infuzi, se dále zvyšuje s rostoucím počtem HLA rozdílů a u nemaligních onemocnění [12].

Minimální dávka jaderných buněk tak byla stanovena následovně:

>**3,0** × 10⁷ jaderných buněk/kg pro **6/6 HLA** kompatibilních jednotek,

>**4,0** × 10⁷ jaderných buněk/kg pro **5/6 HLA** kompatibilní jednotky a

>**5,0** × 10⁷ jaderných buněk/kg pro **4/6 HLA** kompatibilních jednotek [22, 9].

Na úspěšnost transplantace má obzvlášť velký vliv dávka CD34⁺ buněk. Na základě nedávných analýz byla **dávka $1,7 \times 10^5$ CD34/kg** stanovena jako **prahová**, pod níž se pravděpodobnost přežití výrazně snižuje a to zejména u příjemců jednotek PK se 2 HLA rozdíly. Vyšší dávka CD34⁺ buněk ve štěpu však může částečně snížit negativní dopad rozdílů v HLA na přežití. Proto by měl být výběr štěpu PK založen především na dávce CD34⁺ buněk a sekundárně na stupni rozdílnosti HLA. PK jednotky obsahující méně než $1,7 \times 10^5$ CD34/kg by měly být považovány za nedostatečné pro rutinní použití [12, 16, 7].

Při výběru jednotky si musíme uvědomit, že po rozmražení je průměrná ztráta ve výši 25% jaderných buněk, převážně granulocytů [8].

Pro mnoho dospělých pacientů a pro větší děti nejsou k dispozici žádné jednotky PK, které by splňovaly tyto požadavky na buněčnou dávku. Abychom překonali danou překážku, je potřeba, aby pacient podstoupil dvojitou transplantaci PK, kdy jsou mu podány dvě jednotky PK současně ke zvýšení buněčné dávky (viz 3.7.2.2) [8].

3.7.1.2 Vliv HLA na výsledek transplantace PK

Klinické zkušenosti ukázaly, že jak buněčná dávka, tak stupeň HLA shody jednotek PK koreluje s příhojením a výsledky transplantace [16, 7].

Pro shodu tkáňových znaků se využívá HLA typizace v 6 znacích. Ideální shoda mezi dárce a příjemcem je 6 ze 6 znaků. U BM se toleruje u nepříbuzenských transplantací 5 ze 6, u příbuzenských i 3 ze 6, ale samozřejmě je zde pravděpodobnost většího množství komplikací. Jde zvláště o reakci štěpu proti hostiteli. Z toho hlediska je zajímavé, že u krvetvorné tkáně z PK je tato komplikace v menším procentu a při transplantaci se toleruje shoda až 4 ze 6 [12, 27]. Štěp má zase menší efekt reakce štěpu proti leukémii, tedy dokáže hůře likvidovat zbylé nádorové buňky u leukemických onemocnění [7].

Většina transplantací má jeden nebo dva rozdíly v HLA. Zdá se, že zvyšující se počet rozdílů prodlužuje dobu, než dojde k uchycení štěpu, zvyšuje TRM i výskyt III – IV stupně GvHD a snižuje relapsy akutní leukémie.

Negativní vliv rozdílů v HLA částečně překoná zvyšující se dávka buněk [16]. Aktuální doporučení tedy jsou, použití jednotky PK s maximálně 2 rozdíly v HLA a $> 3 \times 10^7$ jaderných buněk/kg nebo $> 2 \times 10^5$ CD34⁺ buněk/kg. U nemaligních onemocnění, kde je riziko odmítnutí vyšší, by měla být dávka zvýšena, je potřeba se vyhnout jednotkám s $< 3,5 \times 10^7$ jaderných buněk/kg a dvěma nebo více HLA rozdíly. Pokud není k dispozici jednotka s těmito charakteristikami, hledají se dvě jednotky s celkovou dávkou $> 3 \times 10^7$ jaderných buněk/kg a ne více než s jedním HLA rozdílem mezi oběma jednotkami a pacientem [11, 12].

Rozdíly v HLA tak mají zásadní vliv na přežití po transplantaci PK u nemaligních onemocnění, ale ne u maligních.

Ačkoli je aktuálně v mezinárodním registru dárců kostní dřeně 8 milionů jedinců, více než 30% pacientů potřebujících transplantaci stále nemůže najít dárce, který by se lišil maximálně v 1 antigenu HLA. U pacientů léčených nepříbuzenskou BM totiž bylo prokázáno, že i jediný HLA rozdíl zvyšuje riziko úmrtí po transplantaci (TRM) a nepříznivě ovlivňuje přežití, zčásti vyvolané vysokým rizikem GvHD a oportunními infekcemi v každé věkové skupině [16, 7].

Přípustný nesoulad v HLA u transplantace PK tak zvyšuje šance na nalezení vhodné jednotky pro každého pacienta a to i pro ty s neobvyklými typy tkání [16, 9].

3.7.2 Co-infuse MSC a dvojitá transplantace PK

Za účelem zlepšení přihojení štěpu PK a zvýšení šancí na přežití po transplantaci, byla zkoumána řada metod, např. použití dvojitě transplantace PK nebo co-infuze MSC (mesenchymální stromální buňky) [26, 8].

3.7.2.1 Co-infuze MSC

První velká klinická studie o využití MSC pro urychlení obnovy krvev tvorby po alogenní HSCT byla provedena u 46 pacientů transplantovaných od HLA identického sourozence. Co-infuze MSC nebyla spojena s nežádoucími účinky; k obnově krvev tvorby došlo u většiny pacientů a středně těžká až těžká akutní GvHD byla pozorována u 28% pacientů [6]. Tato studie naznačila, že co-transplantace krvev tvorných kmenových buněk a MSC může modulovat hostitelskou aloreaktivitu a/nebo podporovat lepší přihojení dárcovské krvev tvorby, což snižuje riziko předčasného selhání štěpu, když je přítomná rozdílnost v HLA mezi dárcem a příjemcem [26].

Celkově tyto údaje naznačují, že co-infuze MSC může být nadějnou strategií pro optimalizaci přihojení progenitorů PK a to zejména pokud jsou přítomny rozdíly v HLA mezi dárcem a příjemcem [26, 6].

3.7.2.2 Dvojitá transplantace PK

V průběhu let se vytvořil konsensus, že 3×10^7 jaderných buněk/kg tělesné váhy představuje hraniční hodnotu buněčné dávky PK nezbytnou pro pevné uchycení štěpu. Zatímco této buněčné dávky je možné dosáhnout s jedinou jednotkou PK u malých dětí, často je to nemožné u dospělých příjemců, resp. u příjemců s tělesnou hmotností větší než 40-50kg [6].

Jedna z možností, jak dosáhnout prahové hodnoty buněčné dávky a následného uchycení štěpu u dospělých je co-infuze dvou částečně HLA shodných PK jednotek [22, 29]. Tyto jednotky musí být také částečně HLA kompatibilní s příjemcem [9]. Předběžné výsledky ukazují, že dvojitě transplantace PK zvyšují míru přihojení štěpu u dospělých a větších dětí, snižují výskyt relapsů a TRM [29, 8]. Čas přihojení zůstává podobný až mírně snížený v porovnání s časem přihojení, který následuje po jedné jednotce PK [6]. Výskyt III a IV stupně

akutní GvHD je podobný v obou skupinách [6] a jednoletá incidence TRM je výrazně nižší po dvojité transplantaci PK [7].

Zajímavé je, že z krátkodobého hlediska mají na krvetvorbě podíl obě jednotky PK, dlouhodobě je však krvetvorba odvozena jen od jedné jednotky. Otázkou zůstává, jaké biologické mechanismy ovlivňují predominanci jedné ze dvou jednotek PK u dvojité PKT. Údaje poskytnuté Barkerem a dalšími uvádějí, že celkový počet jaderných buněk, dávka CD34⁺ buněk, stejně jako rozdíly v HLA mezi dárce a příjemcem nepředpovídají, která z těchto dvou jednotek PK bude dominantní [6].

Díky dvojitým transplantacím v současné době většina pacientů, kteří jsou kandidáti na alogenní transplantaci HSC, najde dárce, což vede celosvětově k nárůstu počtu transplantací pupečnickové krve prováděných u dospělých [11, 29].

3.7.3 Využití PK v léčbě nemaligních chorob

Kmenové buňky PK mají schopnost regenerovat četné druhy tkání a jsou tak schopny dát vznik hematopoetickým, epiteliálním, endoteliálním a nervovým tkáním *in vitro* a *in vivo*. PKT tak může být použita k léčbě nejrůznějších chorob, včetně kardiovaskulárních, očních, ortopedických, neurologických a endokrinních onemocnění [10].

Klinické studie začaly používat PK kmenové buňky k léčbě Fanconioho anémie, dědičných metabolických poruch, juvenilního diabetu, dětské mozkové obrny a periferních cévních onemocnění [9]. Díky tomu, že kmenové buňky PK mohou dát také vznik epitelové tkáni, může být PKT vhodná jako terapeutická metoda v léčbě různých poranění oka (rohovky), kůže (hojení ran) a dalších tkání (např. střevní a plicní) [10]. Při klinických pokusech (humánní léčebné postupy, které ještě nejsou používány v každodenní lékařské praxi) se s úspěchem aplikují kmenové buňky při léčení srdečního infarktu, krvácení do mozku, artrózy a nespočetných dalších chorob.

Kmenové buňky PK lze použít i k léčbě různých poškození mozku, popř. mezenchymální stromální buňky PK k tvorbě kostí a chrupavek, avšak tento potenciál kmenových buněk PK je teprve ve fázi zkoumání [10].

I u nemaligních nemocí vyšší dávka buněk v PK pozitivně ovlivňuje uchycení štěpu a přežití. Naopak negativní vliv na uchycení štěpu, GvHD a přežití má HLA rozdíl a vyšší věk pacienta [9].

3.7.4 Transplantace PK u dětí

Nepříbuzenská transplantace dárcovské PK může být úspěšně použita u dětí [24]. Odhadem do dnešního dne tisíce dětí podstoupily PKT kvůli různým genetickým, hematologickým, imunologickým, metabolickým a onkologickým chorobám [6].

Transplantace PK u dětí má snížený výskyt GvHD [24], srovnatelné myeloidní přihojení, ale opožděnou rekonstrukci krevních destiček a neutrofilů v porovnání s nepříbuzenskou dárcovskou BMT [23, 2]. Přesto se skupiny mezi sebou neliší poměrem výskytu relapsů a pravděpodobností celkového přežití [9].

Celkově lze říci, že nepříbuzenská PKT by měla být zvažována u každého dítěte s maligním nebo nemaligním onemocněním [28]. Po vyhodnocení všech výsledků transplantací bylo nejpozoruhodnější zjištění, že PK lze úspěšně srovnávat s 8/8 kompatibilní nepříbuzenskou BM. Tyto údaje podporují použití HLA kompatibilní nebo inkompatibilní PK u dětí s vysoce rizikovou akutní leukémií, které naléhavě potřebují transplantaci [9].

3.7.5 Transplantace PK u dospělých pacientů

V posledních letech několik vědeckých skupin zveřejnilo výsledky transplantací PK u dospělých pacientů. Na rozdíl od výsledků u dětí transplantace HSC u dospělých je obvykle spojena s vyšším rizikem GvHD, infekcemi, opožděnou imunitní rekonstrukcí a zvýšenou TRM, částečně kvůli vyšší přítomnosti komorbidit v době transplantace. Na rozdíl od dětí použití PK u dospělých bylo více limitováno z důvodu omezené buněčné dávky [27, 9]. Opět i tady vyšší počet CD34⁺ buněk ve štěpu koreloval s lepším výsledkem [3].

Pokud srovnáme výsledky transplantací PK u dospělých s kompatibilní a inkompatibilní nepříbuzenskou BM a kompatibilní a inkompatibilní PBSC zjistíme, že TRM je nejnižší a celkové přežití nejvyšší u pacientů transplantovaných kompatibilní nepříbuzenskou BM/PBSC v porovnání s jinými zdroji, což naznačuje, že tyto zdroje štěpů jsou preferovány, pokud jsou dostupné a když to čas dovolí. Nicméně částečně HLA kompatibilní PK s odpovídající buněčnou dávkou ($> 3 \times 10^7$ jaderných buněk/kg) je vhodnou alternativou, když

není k dispozici HLA kompatibilní nepříbuzenská BM/PBSC nebo pokud je transplantace naléhavá. Příjemci PK a nepříbuzenské inkompatibilní BM/PBSC mají podobnou míru přežití [9].

Celkově výsledky těchto srovnávacích studií a analýz ukázaly, že uchycení štěpu PK lze dosáhnout i u dospělých pacientů, ale je zpožděno v porovnání s nepříbuzenskou BM. I přes větší rozdíly v HLA a vyšší úmrtnost, nepříbuzenská PK nabízí dostatečně slibné výsledky, které jsou srovnatelné s výsledky transplantace BM u dospělých pacientů s hematologickými malignitami [10, 16]. PKT by tak měla být zvážena jako možnost alogenního zdroje kmenových buněk pro pacienty, kteří nemají HLA identického dárce kostní dřeně [3], což vede k stejnému závěru, jako u transplantace dětí, že proces hledání dárce BM a PK od nepříbuzenských dárců by měl začínat souběžně, a to zejména u pacientů s akutní leukémií, kde je čas rozhodující [11]. Dávka buněk, ať už jaderných buněk/kg nebo CD34⁺ buněk/kg, koreluje s výsledky ve většině studií [3].

3.7.6 Výhody a nevýhody transplantace pupečnickové krve

Ve srovnání s jinými zdroji alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk PK nabízí značné logistické a klinické výhody zahrnující:

Výhody

- Štěp je většinou zcela vyšetřený a okamžitě připravený k použití [25], takže odpadá doba čekání na dárce, jeho vyšetření a odebrání, to je obzvláště důležité u velmi progresivních chorob, u nichž čekání na vhodného nepříbuzného dárce může být příliš riskantní [18, 9]. Průměrná doba dostupnosti štěpu je 25 – 36 dní, tedy dříve než je tomu u kostní dřeně [8].
- Štěp je fyzicky přítomný v kryobance. Odpadá nejistota, zda dárce bude stále chtít kostní dřeň darovat.
- Vzhledem k menší zralosti dárce (krev zbylá po porodu v pupečníku a placentě patří původem plodu, ne matce) je po transplantaci méně komplikací vyplývajících z imunitních rozdílů mezi dárce a příjemcem (pacientem) – „reakce štěpu proti hostiteli“.
- Snadná možnost další manipulace se štěpem (například rozmnožování buněk krvetvorné tkáně).

- Odběr PK je jednoduchý, bezpečný a bezbolestný.
- Zmrazení PK kmenovými buňkami „zastaví hodiny“ a chrání je před poškozením prostředím, stárnutím a běžnými viry, které by je mohly poškodit [34].
- Rozšíření populace dárců díky toleranci 1 – 2 HLA rozílů ze šesti [25].
- Nižší výskyt a závažnost akutní reakce štěpu proti hostiteli (GvHD).
- Nižší riziko přenosu infekce latentními viry, jako je cytomegalovirus (CMV) a virus Epstein-Barrové (EBV).
- Vyšší frekvence vzácných haplotypů ve srovnání s registry kostní dřeně [8].

Nevýhody

- Objem krvetvorné tkáně je malý s nízkým počtem hematopoetických progenitorových buněk v porovnání s BM nebo PBSC, což zvyšuje riziko selhání štěpu, zpožděného hematopoetického přihojení (engraftment) a zpožděné imunitní rekonstituce, proto je většinou vhodná jen pro transplantace dětí, i když se pracuje na technikách překračujících tato omezení [18, 25].
- Nutnost vybudování kryobank, zajištění jejich provozu.
- Menší efekt „reakce štěpu proti leukémii“.
- **Infekce**

Závažné infekce jsou významnou příčinou morbidity a mortality po transplantaci od nepříbuzenského dárce bez ohledu na zdroj HSC [22].

Od začátku transplantací PK byly značné obavy, že naivita novorozeneckého imunitního systému může souviset nejen s nižší GvHD, ale také s infekcemi. Nedávné retrospektivní studie nepotvrdily teorii, že závažná infekce je častější po transplantaci PK u dětí. Ačkoli bakteriální infekce mohou být častější po PKT u dospělých, je riziko úmrtí na infekce stejné jako riziko u jiných typů transplantací [9].

4. Banky pupečnickové krve

Po provedení první transplantace PK na světě v roce 1988 se tento typ transplantací začal poměrně rychle rozšiřovat a došlo tak k celosvětovému zakládání bank PK, ve kterých se v případě potřeby hledá vhodný štěp pro transplantaci. První banky PK byly založeny na počátku roku 1990 v New Yorku, Milánu a Düsseldorfu. Nejrozsáhlejší banka současnosti spadající pod New York Blood Center pod vedením Dr. Pabla Rubinsteina stanovila metody sbírání, zpracování a zmražení PK [1].

Většina bank pupečnickové krve působí za přísných pravidel, podobně jako krevní banky, které jsou zavedeny společnostmi NETCORD, FACT (Nadace pro akreditaci center buněčné terapie) nebo AABB (American Association of Blood Banks) [3].

Štěpy PK se uvádějí v registrech dárců kostní dřeně nebo ve specializovaných mezinárodních registrech. V současné době existují dva mezinárodní registry: *Netcord*, který obsahuje pouze jednotky PK, a *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW), který obsahuje jak dárce kostní dřeně tak PK. V Netcordu je přibližně 200 000 jednotek PK [1] a v BMDW více než 450 000 registrovaných jednotek PK z více než 50 různých bank PK [8]. Většina PK registrovaných v NETCORD jsou také zařazena v BMDW [1].

4.1 Banka PK v ČR

Banka pupečnickové krve ČR (BPK-ČR) byla oficiálně založena v říjnu 1996 jako projekt Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Banka má dvě části: příbuzenskou a nepříbuzenskou. Od roku 1993 se odebírá na Ústavu hematologie a krevní transfúze PK pro příbuzenské transplantace. V roce 1996 vznikla také nepříbuzenská část banky, kam mohou matky darovat PK. První PK však byla odebrána již v srpnu 1994, vyšetřena a kryokonzervována a počátkem listopadu téhož roku byla použita pro příbuzenskou transplantaci pacienta s LAD syndromem (vrozený syndrom imunitní nedostatečnosti). Šlo o první transplantaci PK v ČR. Potransplantační průběh byl sice komplikovaný, ale úspěšný. V současné době je pacient bez známek základního onemocnění [42].

Transplantace PK se v ČR odehrávají zatím pouze ve FN Motol a to u dětských pacientů. Dodnes bylo v ČR provedeno 23 transplantací PK. Z toho šestkrát byl dárce zdravý sourozenec (a z toho třikrát byla podána současně s PK i kostní dřeň od zdravého sourozence)

a sedmnáctkrát byla použita PK anonymních dárců [43]. Česká banka PK vydala dosud k transplantacím 39 štěpů PK.

BPK-ČR je projekt, v rámci kterého spolupracuje mnoho pracovišť po celé republice a jejich počet se každým rokem zvětšuje. Nyní se odběry provádějí již na 13 místech v republice a zpracovávají se ve 2 centrech (Praha, Brno).

4.2 Mezinárodní spolupráce

Banky PK se sdružují v rámci různých projektů a organizovaných skupin s cílem dosáhnout standardního způsobu zpracování a uchování štěpů, stejně jako zlepšit dostupnost těchto štěpů.

BPK-ČR dnes spolupracuje na mezinárodní úrovni se třemi projekty:

1. CBANK (Implementation of a Cord Blood Allocation Network) – jedná se o grantový projekt EU, jehož cílem je standardizace používaných metod, akreditaci jednotlivých pracovišť podle FACT-NETCORD pravidel a zajištění spolupráce mezi jednotlivými bankami PK v Evropě i s významnými pracovišti celosvětově.
2. NETCORD – zabývá se téměř výhradně standardizací postupů zpracování a skladování PK a provozuje celosvětovou databázi pupečnickových štěpů dostupnou na internetu, která umožňuje snazší vyhledávání a rychlé umístění nabídky nových štěpů. Netcord stanovil postupy pro akreditace bank PK ve spolupráci s FACT (Foundation on Accreditation in Cell Therapy). Důsledkem byla dohoda o akreditačním řízení na základě podmínek americké FACT a akreditace probíhají pod hlavičkou FACT-NETCORD [44].
3. EUROCORD – jde o projekt evropské unie, který vznikl z potřeby vyměňovat si mezi bankami navzájem informace. Tento projekt pokrývá komplexně celou problematiku PK počínaje výběrem pro dárcovství, přes vyšetření štěpu až po klinické použití s následným sledováním transplantovaného pacienta, ale větší důraz je přeci jen kladen na klinickou část [28]. Jeho hlavním tématem tak je klinické využití štěpů PK. Představitelé bank pupečnickové krve si díky Eurocordu mohou vyměňovat informace získané reálnou zkušeností a setkávat se na konferencích nejen mezi sebou, ale také s odborníky v oblasti transplantací krvetvorné tkáně [1, 44].

4.3 Komerční banky PK

Tyto banky zajišťují odběr a skladování PK pro konkrétního jedince. Využívají se především pro autologní účely a jelikož jde o komerční společnosti, jedná se o službu hrazenou klientem.

4.4 Etické problémy odběru a skladování PK

Odborníci z oblasti medicínského výzkumu se shodují na tom, že pupečnicková krev je cenným zdrojem kmenových buněk a pokud je to možné, měla by být odebrána a uskladněna. Nikdo tak nepochybuje o významu PK pro léčbu řady vážných onemocnění.

Ovšem jak se rozhodnout? Darovat PK veřejné bance nebo ji uskladnit výhradně pro vlastní potřebu dítěte?

Jen těžko lze odpovědět na danou otázku. Mezi autologní a dárcovskou PK existuje několik podstatných rozdílů a záleží jen na nastávajících rodičích, kterou z nich zvolí.

1. DPK patří veřejnému registru a může být použita u pacientů, kteří potřebují transplantaci hematopoetických buněk. Na druhé straně, autologní pupečnicková krev je vlastním „majetkem“ dítěte (do dosažení plnoletosti dítěte jsou vlastníkem PK rodiče) a může tak být použita výhradně pro jeho vlastní potřebu.
2. Kritéria pro odběr a zpracování dárcovské pupečnickové krve jsou tak mnohem přísnější než v případě autologní PK, kde krev nemůže být odebrána pouze v případě, že rodička prodělala velmi vážné onemocnění.
3. Samozřejmostí je, že privátně uskladněná PK je v případě potřeby mnohem dříve k dispozici než dárcovská pupečnicková krev.
4. A v neposlední řadě velmi podstatným rozdílem je finanční stránka skladování. V případě dárcovské PK neplatí rodiče žádné poplatky. U autologní PK se poplatky pohybují v rozmezí 20 – 40 tisíc v závislosti na délce skladování PK, v současnosti je maximum 20 let.
5. Dalším důležitým rozdílem je vhodnost použití PK při určitých typech onemocnění. U některých postačí vlastní PK, u jiných je potřeba vyhledat zdravého dárce ve veřejném registru. Pokud se u dítěte vyskytne vrozené onemocnění, není možné takovou PK použít pro vlastní potřebu dítěte, tehdy je potřeba vyhledat vhodného dárce v národních a mezinárodních registrech [48, 49, 50].

Výše uvedená otázka vyvolává řadu etických rozporů.

Na jedné straně se mnoho odborníků staví pro skladování vlastní PK, například v rodinách, kde se vyskytují dědičné poruchy vyvolávající choroby léčené transplantací krvetvorných buněk, a na základě celé řady dalších výhod uvedených výše.

Na straně druhé je mnoho z nich proti skladování vlastní PK a to hlavně z důvodu velmi malé pravděpodobnosti jejího budoucího použití u daného dítěte (dárce).

Pravděpodobnost, že se dárci bude hodit jeho vlastní pupečnicková krev, odhadují na 1 : 200 000.

Navíc existuje v případě leukémií řada pádných argumentů proti použití pacientových vlastních krvetvorných buněk, protože si zřejmě nesou dědičnou informaci mutace, jež stála v pozadí vzniku leukémie. I v případech, kdy by snad transplantace vlastních krvetvorných buněk připadala úvahu, objeví se zde další problém – malé množství buněk v PK. Z tohoto důvodu lze PK použít nanejvýš u dítěte[50].

Britská Royal College Obstetricians and Gynaecologists tak nedoporučila skladování pupečnickové krve pro pozdější potřebu samotného dárce s odůvodněním, že je to z vědeckého hlediska neodůvodněné a organizačně náročné. Italové soukromé banky pupečnickové krve zakázali [50].

5. Cíle diplomové práce

1. Zpracování pupečnickové krve novou metodou v uzavřeném systému, včetně následné kultivace hematopoetických buněk a interpretace výsledků.
2. Měření exprese znaku CD34 na leukocytech pomocí flow cytometrie a to ve vzorcích před a po rozmražení pupečnickové krve.
3. Srovnání naměřených hodnot s demografickými údaji o matce a dítěti, vyvození hlavních trendů (Korelují naměřené hodnoty s demo-údaji? Mění kryokonzervace pupečnickové krve její vlastnosti a tím schopnost přihojení štěpu?)

6. Materiál a metody

6.1 Materiál

6.1.1 Pupečnicková krev

Pro experiment popsaný v této práci bylo použito 50 dárcovských pupečnickových kreví, které byly získány na základě informovaného souhlasu matky o dárcovství PK do registru Banky PK. Všechny PK byly zpracovány v uzavřeném systému podle níže uvedeného postupu. Navíc byl z každého vaku PK odebrán 1 ml vzorku na kultivaci hematopoetických progenitorů a stanovení počtu CD34⁺ buněk před zamražením. Tato dvě vyšetření se běžně při zpracování DPK nedělají.

6.1.2 Spotřební materiál

Materiál	Popis	Složení
<i>Odběrový vak na dárcovskou a příbuzenskou Pk</i>	Vak pro odběr dárcovské a příbuzenské PK	Sterilní vak s obsahem 25 ml antikoagulačního roztoku CPD, 2 hadičky s odběrovými jehlami a krytem
<i>Sterilní set I. – Jednocestný 10 ml (obr. 10)</i>	Pro odběr vzorků, pro zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DLI, DPK, APK	1x hadička, 1x stříkačka 10 ml, 1x tlačka
<i>Sterilní set II. – Dvoucestný 20 ml</i>	Pro zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DLI, DPK, APK	2x hadička, 1x stříkačka 20 ml, 3x tlačka
<i>Sterilní set III. – Dvoucestný 50 ml (obr. 11)</i>	Pro zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DLI, DPK, APK	2x hadička, 1x stříkačka 50 ml, 3x tlačka
<i>Zamražovací vaky Origen 250 ml, 500 ml, 750 ml</i>	Pro kryokonzervaci dárcovské a příbuzenské PK	Sterilní vak s hadičkami a tlačkami, štítky na popis
<i>Sterilní Transfer vak 600 ml</i>	Pomocný vak při zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DLI, DPK, APK; vak pro rozplnění albuminu 5% lidského	Vak s hadičkou, která je zakončena bodcem s krytkou
<i>Uzavřený Cryo prep set (obr. 14)</i>	Při zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DLI, DPK, APK	6x hadička, 7x tlačka, 1x stříkačka 50 ml, 1x filtr, 1x vak
<i>Kryotuba 1,8 ml</i>	K odběru vzorků při zpracování a kryokonzervaci hematopoetických buněk	Polypropylen

<i>Zkumavka S – Monovete 4,9 ml K3 EDTA</i>	Zkumavka pro odběr nesrážlivé krve (plazma)	Plast, EDTA
<i>Zkumavka S – Monovette 5,5 ml Z</i>	Zkumavka pro odběr srážlivé krve (sérum)	Plast
<i>Injekční jehla zelená</i>	K aspiraci roztoků a k píchnutí hemokultury při zpracování a kryokonzervaci BM, PBSC, DPK, APK	Kov – nerez, PVC materiál
<i>Injekční jehla růžová</i>	K aspiraci roztoků	Kov – nerez, PVC materiál
<i>Centrifugační zkumavka 10 ml s kulatým dnem</i>	Na rozplnění kultivačního média Methocultu GF H 4434, k centrifugaci hematopoetických a nehematopoetických buněk	Polystyrene
<i>Sterilní zkumavka 15 ml zakalená</i>	Pro centrifugaci hematopoetických buněk u krátkodobých kultivací progenitorů	Polystyrene
<i>Sterilní zkumavka 50 ml</i>	Pro přípravu promývacího roztoku při krátkodobých kultivacích (CFU-GM), pro centrifugaci	Polypropylen
<i>Sterilní zkumavka 10 ml s červenou zátkou</i>	Pro odběr vzorků z vaku BM, PBSC, DPK, APK, pro centrifugaci	Polystyrene
<i>Zkumavka Tapval nesterilní 3 ml</i>	K odběru vzorků k laboratornímu vyšetření	Polystyrene
<i>Zkumavka sterilní 2 ml – ependorfka</i>	K sterilnímu rozplnění DNAsy	Polystyrene
<i>Kultivační miska 35 x 10 mm</i>	Miska pro nasazení krátkodobé a dlouhodobé kultivace hematopoetických progenitorů a miska na sterilní vodu při kultivacích	Polystyrene
<i>Kultivační miska 140 x 20 mm</i>	Pomocná miska při krátkodobých kultivacích hematopoetických progenitorů	Polystyrene
<i>Sterilní rukavice</i>	Pro sterilní práci	Latexový materiál
<i>Sterilní pasteurova pipeta 3 ml</i>	Při kultivaci hematopoetických buněk	Plast
<i>Nesterilní pasteurova pipeta 3 ml</i>	Pro stažení séra a plazmy	Plast
<i>Injekční stříkačky 2, 5, 10, 20, 50 ml</i>	K aspiraci roztoků a vzorků	PVC materiál
<i>Bürgerova komůrka (hemacytometr), krycí sklíčko, sterilní špičky</i>		

6.1.3 Roztoky a reagentie

Materiál	Popis	Složení
<i>Lidský albumin 5%</i>	Pro přípravu kryokonzervačního roztoku, pro doplnění objemů BM, PBSC, DLI, APK a jako náhrada plazmy při její výměně, k přípravě roztoků určených pro kultivaci	Lidský albumin 5 g/100ml, natrium oktanoát, sodná sůl acetyltryptofan, chlorid sodný, voda na injekci. Roztok obsahuje mezi 130-160 mmol/l sodíku a max. 2 mmol/l draslíku
<i>100% DMSO</i>	Pro přípravu kryokonzervačního roztoku	Dimethylsulfoxid > 99,9%, voda < 0,1%
<i>Heparin</i>	Pro přípravu promývacího roztoku, pro krátkodobé kultivace progenitorů po rozmražení	Heparin natricum 5000 IU v 1ml, methylparabenum, voda na injekci
<i>Fluorescenční činidlo</i>	Pro stanovení vitality hematopoetických buněk BM, PBSC, DPK	50 mg ethidium bromid (propidium jodid), 15 mg akridinová oranž, 10 ml ethylalkohol, PBS (fosfátový pufr)
<i>Monoklonální protilátka CD34-PE</i>	Protilátka k průkazu antigenu $CD34^+$	$CD34^+$, PBS (fosfátový pufr) 0,1% azid sodný, fluorochrom phycoerytrin (PE)
<i>IMDM médium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)</i>	Při krátkodobých a dlouhodobých kultivacích hematopoetických progenitorů	2% FBS, antibiotika – Penicilin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml); L-glutamin (2mM), hydrogenuhličitan sodný, glukóza, sodík pyruvátu, selen a další komponenty
<i>Methocult GF H 4434</i>	Kultivační médium pro krátkodobou kultivaci hematopoetických progenitorů	1% metylcelulóza (4000cps), 30% fetální bovinní sérum, 1% albumin, 10^{-4} M 2-merkaptóetanol, 2 mM L-glutamin, 50 ng/ml rh SCF, 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-3, 3 U/ml EPO, IMDM
<i>Hemokultura PEDI</i>	Pro kultivaci aerobních a anaerobních mikroorganismů z vaků BM, PBSC, DPK, APK	Kultivační médium (4 ml)
<i>Chlorid amonný (NH_4Cl) sterilní 0,8%</i>	Pro lýzu erytrocytů při zpracování vzorků na kultivaci	Chlorid amonný 0,8%
<i>Ethanol 70%</i>	Desinfekce pracovních ploch	
<i>Protilátka CD45-FITC</i>	Protilátka k průkazu antigenu $CD45^+$	$CD45^+$, fluorochrom fluorescein isothiocyanate (FITC)
<i>7-AAD (7-Aminoactinomycin D)</i>	Je používána jako fluorescenční marker pro DNA ve fluorescenční mikroskopii a	Fluorescenční chemická sloučenina se silnou afinitou k DNA.

	flow cytometrii	
<i>Roztok A</i>	Roztok pro lýzu buněk	Kyselina mravenčí, destilovaná voda
<i>Roztok B</i>	Roztok pro lýzu buněk	Na ₂ CO ₃ (uhličitan sodný), NaCl (chlorid sodný), Na ₂ SO ₄ (síran sodný), destilovaná voda

6.1.4 Přístroje

- Programovatelný zamražovač, Ice Cube 1810
- Box s laminárním prouděním, Biohazard IIA
- Sterilní svářečka Haemonetics TCD B40 (obr. 9)
- Svářečka stolní pístová Hemtrom III, Barter
- Váhy Scout Pro
- Míchačka vaků, Tool
- Vortex
- Automatické pipety
- Mikroskop inverzní – Olympus CKX 41
- Fotoaparát Olympus
- Inkubátor
- Fluorescenční mikroskop – Optiphot 2
- Flow cytometr – Cytomics FC 500, Beckman Coulter – se software CXP
- Analyzátor krevního obrazu – Abbott

6.2 Metodika

6.2.1 Zpracování a kryokonzervace dárcovské pupečnickové krve

Během odběru DPK je také odebrán vzorek srážlivé krve ze žíly matky, vzorek krve z placentární žíly a nesrážlivá krev od matky. Při příjmu DPK do laboratoře tak zkontrolujeme, zda je kompletně vyplněná průvodní dokumentace a zda je v aluminiovém obalu označený vak s PK, dvě označené zkumavky se srážlivou krví (jedna od matky a vzorek PK) a jedna označená zkumavka s nesrážlivou krví (vzorek od matky).

6.2.1.1 Zjištění objemu DPK

1. Z aluminiového obalu vyjmeme (obr. 2):
 - odběrový vak s PK
 - 1 zkumavku se srážlivou krví od matky
 - 1 zkumavku se srážlivou PK krví
 - 1 zkumavku s nesrážlivou krví od matkyVše důkladně vydesinfikujeme. Zkumavky dáme stočit.
2. Pístovou svářečkou zatavíme hadičku odběrového vaku v místě rozdvojení hadičky.
3. Vak s PK umístíme na digitální váhy a na základě hmotnosti provedeme výpočet objemu PK:

$$V_{PK} [ml] = \frac{M_V - 55}{1,055}$$

V_{PK} – objem odebrané PK [ml]

M_V – hmotnost vaku s odebranou PK [g]

55 – hmotnost prázdného vaku a hadičky [g]

1,055 – koeficient převádějící hmotnost krve v gramech na mililitry (100 ml krve = 105,5 g)

4. Je-li objem PK **nižší než 60 ml**, je DPK **zlikvidována** pro nedostatečný objem.
5. Je-li objem PK **vyšší než 60 ml**, je proveden **odběr vzorku** (0,5 ml) pro zjištění krevního obrazu, tedy pro zjištění buněčnosti DPK.

6.2.1.2 Odběr vzorku z DPK pro zjištění krevního obrazu (pro zjištění buněčnosti PK)

1. Hadičku odběrového vaku pomocí svářečky sterilně spojíme s hadičkou Setu I. Poté odběrový vak zavěsíme na stojan, povolíme tlačky na spojených hadičkách a stříkačkou, která je součástí Setu I., nasajeme 0,5 ml PK.
2. Pístovou svářečkou zatavíme hadičku Setu I. před konusem stříkačky a 0,5 ml PK vstříkneme do nesterilní zkumavky tapval.
3. Vzorek na krevní obraz označíme štítkem¹, vypíšeme žádanku a změříme.

¹ Štítek: VZOREK + počáteční písmeno příjmení matky
KO+ diff.
PK po odběru, datum

4. Pomocí výpočtu zahrnujícího naměřenou hodnotu WBC (počet leukocytů v 1 ml PK) z krevního obrazu zjistíme celkovou buněčnost štěpu PK.

$$\boxed{WBC [1 \times 10^7 / ml] = VPK_{pz} \times \text{hodnota WBC}}$$

$$\boxed{VPK_{pz} [ml] = (V_{PK} + 23 \text{ ml CPD}) - 3 \text{ ml}}$$

WBC – celková buněčnost štěpu PK [$1 \times 10^7 / ml$]

VPK_{pz} – objem PK před zpracováním [ml]

hodnota WBC – celkový počet leukocytů v 1 ml PK [$1 \times 10^6 / ml$] – hodnota získaná z krevního obrazu

V_{PK} – objem odebrané PK [ml]

CPD – protisrážlivý roztok v odběrovém vaku (23 ml CPD ve vaku + 2 ml CPD v hadičkách)

3 ml – na vzorky (0, 5 ml krevní obraz, 0, 3 ml vitalita, 1 ml krevní skupina, 1, 2 ml HLA)

5. Je-li celková hodnota WBC **nižší než $80 \times 10^7 / ml$** , je DPK zlikvidována pro **nízkou buněčnost**.
6. Je-li celková hodnota WBC **vyšší než $80 \times 10^7 / ml$** , je DPK **zpracována a kryokonzervována**.

6.2.1.3 Zpracování a kryokonzervace DPK

1. Provedeme výpočet celkového zamrazovacího objemu DPK:

$$\boxed{V_{CPK} [ml] = (VPK_{pz} + V_{15\%DMSO}) - 6 \text{ ml}}$$

V_{CPK} – celkový zamrazovací objem PK [ml]

VPK_{pz} – objem PK před zpracováním – po odečtu 3 ml na vzorky [ml]

V_{15%DMSO} – objem kryoprotektivního roztoku – rovná se objemu VPK_{pz} [ml]

6 ml – na vzorky (1 ml – kultivace PK a změření CD34⁺ buněk po rozmražení, 5 ml – archivní vzorky)

2. Vypočítáme objem kryoprotektivního roztoku, tj. ředění 100% DMSO na 15% DMSO:

$$\boxed{V_{15\%DMSO} [ml] = VPK_{pz} \times 0,15}$$

VPK_{pz} – objem PK před zpracováním [ml]

$V_{15\%DMSO}$ – objem kryoprotektivního roztoku [ml]

Vypočtené množství 100% DMSO doředíme 5% lidským albuminem na objem PK před zpracováním.

- Podle celkového objemu PK v odběrovém vaku zjistíme, jaká bude velikost zamrazovacích vaků. Odebraný objem DPK rozdělíme do dvou zamrazovacích vaků:

$\frac{2}{3}$ zamrazovacího objemu → **vak A**

$\frac{1}{3}$ zamrazovacího objemu → **vak B**

Objem suspenze PK ve vaku bude redukován vždy na nejbližší nižší objem vhodný k zamražení.

Rozdělení do vaků podle zamrazovacích objemů PK:

Origen 250 ml: 30 ml.....70 ml	Průměr: 50 ml
Origen 500 ml: 55 ml.....100 ml	Průměr: 75 ml
Origen 750 ml: 80 ml.....190 ml	Průměr: 135 ml

Příslušné zamrazovací vaky A, B označíme přiděleným kódem DPK, objemem PK v daném vaku /A nebo B a datem porodu.

Jednu hadičku vaku A sterilně pomocí svářečky spojíme s hadičkou Setu I (obr. 12).

- Do kovového stojanu si připravíme sedm kryotub, které popíšeme kódem DPK a datem porodu. Kryotuby označíme čísly 0, 0, 1, 1, 2, 7, 8. Zvlášť si připravíme ještě dvě kryotuby s označením HLA-1 a HLA-2, kódem DPK a datem porodu.
- Do kryotuby 8 odebereme ze zkumavky s nesrážlivou krví od matky plazmu a do kryotuby 7 ze stejné zkumavky odebereme 0,9 ml plné krve. Stojan s kryotubami umístíme do ledničky.
- Sterilně spojíme hadičku Cryo prep setu s hadičkou transfer vaku, v němž je 5% lidský albumin (obr. 16). Vak s albuminem zavěsíme na stojan a povolíme tlačky na příslušných hadičkách.
- Stříkačkou (50 ml), která je součástí Cryo prep setu, nasajeme vypočítané množství 5% albuminu potřebné pro přípravu kryoprotektivního roztoku. Zavřeme tlačku na

hadičce transfer vaku s albuminem, povolíme tlačku na hadičce od vaku Cryo prep setu a asi 2/3 z tohoto nasátého množství přepustíme do vaku Cryo prep setu. Pístovou svářečkou zatavíme hadičku transfer vaku s 5% albuminem.

8. Na stříkačku (20 ml) nasadíme zelenou jehlu a propíchneme membránu lékovky se 100% DMSO a aspirujeme vypočítaný objem DMSO.
9. Sejmeme jehlu a stříkačku nasadíme na bakteriologický filtr Cryo prep setu, povolíme tlačky na příslušných hadičkách a za stálého míchání přepouštíme DMSO do vaku Cryo prep setu (obr. 16).
10. Do vaku Cryo prep setu nakonec přepustíme i zbylé množství 5% albuminu, které zůstalo ve stříkačce (50 ml). Uzavřeme všechny tlačky na prep setu a uložíme jej do lednice.
11. Hadičku odběrového vaku s PK spojíme pomocí svářečky sterilně s jednou hadičkou Setu III. a druhou hadičku Setu III. spojíme s hadičkou zamrazovacího vaku B.
12. Odběrový vak zavěsíme na stojan a povolíme příslušné tlačky na hadičce. Pomocí stříkačky (50 ml) přepustíme z odběrového vaku vypočtenou 1/3 PK do zamrazovacího vaku B.
13. Uzavřeme tlačky a pístovou svářečkou zatavíme zamrazovací vak B a uložíme jej předchladit do lednice.
14. Na uvolněnou hadičku Setu III. napojíme pomocí svářečky hadičku zamrazovacího vaku A (obr. 13). Stříkačkou (50 ml) přepustíme do vaku 2/3 PK, tedy zbylou krev. Při přepouštění si necháme ve stříkačce 2,5 ml na vzorky.
15. Uzavřeme tlačky a pístovou svářečkou hadičku zamrazovacího vaku A zatavíme a vak dáme do lednice.
16. Hadičku Setu III. zatavíme u konusu stříkačky (50 ml) a 2,5 ml PK rozdělíme následovně:

0,3 ml do kryotuby **HLA-1**

0,9 ml do kryotuby **HLA-2**

1 ml na **krevní skupinu** do označené zkumavky tapval

0,3 ml na **vitalitu** do označené zkumavky tapval

Zkumavky tapval na krevní skupinu a vitalitu musí být označeny štítkem s přiděleným kódem DPK, požadovaným vyšetřením a datem zpracování.

17. Kryotuby HLA-1 a HLA-2 uložíme do příslušných krabiček v hlubokomrazícím boxu (-80°C)².
18. Ze zkumavek se srážlivou krví (jedna – krev od matky, druhá – vzorek PK) odebereme plazmu na serologické vyšetření do štítkem označených zkumavek tapval (kód DPK, požadované vyšetření a datum zpracování).
19. Vypíšeme žádanky pro vzorky na zjištění krevní skupiny a serologické vyšetření³ a dáme analyzovat. Změříme vzorek na vitalitu PK (postup viz. 6.2.3).
20. Připravíme si zamrazovací přístroj Ice Cube a necháme jej vychladit na 4 °C. V laminárním boxu si do 2 ml stříkačky naaspirujeme 0,1 ml 100% DMSO.
21. Z lednice vyjmeme Cryo prep set a zamrazovací vaky A, B. Volné hadičky Cryo prep setu postupně svářečkou spojíme s hadičkami zamrazovacích vaků A, B a zbylou hadičku Cryo prep setu spojíme sterilně s transfer vakem (600 ml).
22. Vak Cryo prep setu s kryoprotektivním roztokem a zamrazovací vaky vložíme do předchlazených gelových vaků (obr. 15). Zamrazovací vaky umístíme na míchačku a vak Cryo prep setu zavěsíme na stojan (obr. 17).
23. Na příslušných hadičkách povolíme tlačky a stříkačkou (50 ml) aspirujeme 1/3 kryoprotektiva, které pomalu a za stálého míchání zamrazovacích vaků přepouštíme do vaku B.
24. Po přepuštění celé 1/3 kryoprotektiva tlačky uzavřeme a zamrazovací vak B vyjmeme z gelového vaku a umístíme do plazmaextraktoru. Otevřeme tlačky do transfer vaku a opatrně vytlačíme přebytečný vzduch z vaku B. Poté tlačky na hadičkách uzavřeme a pístovou svářečkou zatavíme hadičku zamrazovacího vaku B a to na třech místech, čímž nám vzniknou 3 segmenty.
25. Zamrazovací vak B vyjmeme z plazmaextraktoru a umístíme mezi dvě předem vychlazené desky, které zabezpečíme dvěma kovovými sponami a vložíme do komory zamrazovače předchlazeného na 4 °C (obr. 18).
26. Poté opakujeme stejný postup se zamrazovacím vakem A (viz odstavce 24, 25), ale přidáváme zbylé 2/3 kryoprotektiva. V okamžiku, kdy z vaku A v plazmaextraktoru vypustíme přebytečný vzduch a uzavřeme tlačku na hadičce od transfer vaku, otevřeme tlačku na napojené hadičce Setu I. a do stříkačky aspirujeme 6 ml suspenze.

² Každá krabička (HLA-1, HLA-2) má 100 pozic. Jakmile se zaplní, posílají se vzorky na HLA typizaci do IKEMu.

³ Serologické vyšetření matky – Anti HCV (hepatitida C); virologické vyšetření PK – HbsAg, HBcAb (hepatitida B), HIV Ag-Ab (infekce virem HIV), Anti TP (syfilis), Anti-CMV (cytomegalovirus), Anti HCV

27. Uzavřeme tlačky a pístovou svářečkou zatavíme hadičku Setu I. před konusem stříkačky.
28. V laminárním boxu suspenzi ze stříkačky rozdělíme po 1 ml do označených kryotub 0, 0, 1, 1, 2 a 1 ml na mikrobiologické vyšetření (hemokulturu)⁴. Do kryotuby 7 přidáme připravený 0,1 ml 100% DMSO.
29. Stojan s kryotubami co nejrychleji vložíme do komory zamrazovacího přístroje a spustíme kryokonzervační program. Podle zvoleného programu zmrazíme vaky s DPK a kryotuby se vzoky na $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$.
30. Veškeré údaje o DPK, o jejím zpracování a průběhu kryokonzervace se uvedou do příslušných protokolů.

Ukončení mražení

1. Po proběhnutí celého mrazícího cyklu, který trvá 1 h 30 min, se mražení ukončuje.
2. Měděné desky s vaky se zmraženou suspenzí a kryotuby vyjmeme z komory zamrazovače. Z desek po uvolnění spon opatrně vyndáme vaky (obr. 19) a vložíme do připravených kartonových krabiček označených štítky s kódem DPK, zamrazovacím objemem daného vaku, datem porodu a pozicí vaku ve vestavbě kontejneru na kryobance, a uložíme do příručního kontejneru s parami tekutého dusíku.
3. Kryotuby uložíme do příslušných pozic v označené krabičce, která je uložena v příručním kontejneru.
4. Vytiskneme záznam o průběhu mražení.

6.2.2 Transport zmražených vaků s DPK z laboratoře na kryobanku a uložení štěpů

Zmražené vaky uložené v krabičkách jsou na kryobanku přemísťovány v polystyrenovém termoboxu s cca 10cm hladinou tekutého dusíku. Na kryobance se jednotlivé krabičky s vakem opatrně umístí do dané pozice v kontejneru. Nejprve se uloží do par LN² (do KARANTÉNY). Jakmile jsou k dispozici výsledky serologického vyšetření a jsou-li negativní, vaky s DPK se přemístí do příslušných pozic v tekutém dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pokud jsou výsledky pozitivní, vaky se přemístí do kontejneru KARANTÉNA, kde jsou uloženy v parách LN².

⁴ Mikrobiologické vyšetření na aerobní a anaerobní mikroby a plísně.

6.2.3 Stanovení viability buněk fluorescenční metodou

1. Připravíme si hemacytometr a krycí sklíčko. Obojí očistíme 70% ethanolem a krycím sklíčkem překryjeme počítací komůrku.
2. Do zkumavky tapval s odebraným vzorkem DPK (0,3 ml) kápneme pasteurovou pipetou 1 kapku fluorescenčního činidla. Tekutiny opakovaným nasátím a vypuštěním pipetou důkladně promícháme.
3. Přiložením pasteurovy pipety se suspenzí k okraji krycího sklíčka a nepatrným zmáčknutím naplníme počítací komůrku suspenzí.
4. V UV světle mikroskopu počítáme minimálně 100 buněk s rozlišením živých (zelené) a mrtvých (červené) buněk.
5. Výpočet viability:

$$\text{Viabilita [\%]} = \frac{\text{Počet živých buněk}}{\text{Počet živých a mrtvých buněk}} \times 100$$

6.2.4 Krátkodobá kultivace hematopoetických progenitorů (CFU-GM) z dárcovské pupečnickové krve po rozmražení

1. Předem si v laminárním boxu napipetujeme 440 μ l IMDM do sterilní 10 ml zkumavky.
2. Poté příslušný zamražený vzorek DPK v kryotubě (označené číslem 0, 0, 1, 1 nebo 2) vyjmeme z příručního kontejneru (krabička se vzorky), vložíme do peanu a pod teplou tekoucí vodou jej částečně rozmrazíme. Kryotubu se vzorkem oťreme a vydesinfikujeme.
3. V laminárním boxu pak z kryotuby odebereme 60 μ l vzorku, které přidáme k 440 μ l IMDM a promícháme na vortexu. Ze zbytku vzorku pomocí fluorescenčního činidla stanovíme vitalitu.
4. Ze vzniklé suspenze napipetujeme 300 μ l, které dáme do zkumavky se 3 ml Methocultu GF 4434 a důkladně promícháme na vortexu (1500-2000 ot./min.).
5. Poté vložíme do zkumavky s Methocultem 2 ml stříkačku s růžovou jehlou.
6. Methocult se nechá přibližně 20-30 min. „vybublinkovat“.

7. Mezitím si připravíme a popíšeme dvě sterilní kultivační misky⁵ (35 × 10 mm) a Petriho misku⁶ (140 × 20 mm).
8. Po „vybublinkování“ natáhneme do stříkačky 2,5 – 2,8 ml Methocultu. Na jehlu nasadíme krytku a opatrně vytlačíme zbylé bubliny, tak aby ve stříkačce zbylo 2,4 ml Methocultu.
9. Vyměníme jehlu za novou a Methocult vytlačíme na 2,2 ml, které rozdělíme po 1,1 ml do každé kultivační misky (I., II.). Krouživým pohybem je médium s buňkami rovnoměrně rozprostřeno po dně misky – je třeba zajistit stejnou výšku média v misce, protože v opačném případě dochází na místě s menším množstvím média k rychlejšímu vysychání.
10. Misky I., II. a misku se sterilní vodou vložíme do velké označené Petriho misky a umístíme do inkubátoru (CO₂ 5%, 37 °C). Je třeba zabránit prudkým pohybům s miskou, které mohou vést k porušení celistvosti vznikajících kolonií. Případný úbytek sterilní vody ve třetí misce doplňujeme, abychom zabránili vysychání média.
11. Kultivace se odečítá za 14 – 16 dní na inverzním mikroskopu. Odečítají se kolonie CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-M a CFU-GEMM.
12. Celkový počet kolonií ve štěpu se vypočítá následujícím vzorečkem:

$M_{I.} + M_{II.}$	×	Celkový zamr.obejm DPK
-----		-----
2		100
$M_{I.}$ = miska I. $M_{II.}$ = miska II.		

13. Veškeré údaje o kultivaci DPK po rozmražení jsou zaznamenány do příslušného protokolu.

6.2.5 Flowcytometrická analýza PK před a po rozmražení

Zamražené vzorky DPK

1. Vzorky rychle rozmrazíme ve vodní lázni (37 °C). V případě vyššího počtu vzorků rozmrazujeme postupně s odstupem 5 – 10 minut a nerozmrazujeme všechny vzorky najednou.

⁵ Misky označíme římskou číslicí I. nebo II., kódem DPK, „po rozmražení“.

⁶ Petriho misku označíme kódem DPK, „DPK po rozmražení“ a datem odečtu.

2. Do zkumavky s 5 μ l značených monoklonálních protilátek CD34-PE (Becton-Dickinson, U.S.A) a 3 μ l 7-AAD (7-amino-actinomycin D) napipetujeme 100 μ l vzorku DPK a necháme 30 minut inkubovat v chladu a tmě – v uzavřené polystyrenové krabici se suchým ledem.
3. Poté provedeme standardně lýzu.
 - a) Nejprve přidáme 600 μ l roztoku A (300 μ l 99% kyseliny mravenčí, 300 ml destilované vody) a směs necháme 10 minut inkubovat při pokojové teplotě.
 - b) Poté přidáme 280 μ l roztoku B – stabilizační roztok – (1,8 g Na_2CO_3 , 4,3 g NaCl, 9,4 g Na_2SO_4 a 300 ml destilované vody).
4. Vzorek změříme ve flow cytometru.
5. Provedeme analýzu na protokolu CD34 UCB (vytvořená gatovací strategie).

Nativní vzorky

1. Do zkumavky s 3 μ l CD34-PE (BD), 3 μ l CD45-FITC a 3 μ l 7-AAD přidáme 80 μ l vzorku DPK a inkubujeme 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.
2. Provedeme klasickou lýzu s roztoky A a B (viz zamražené vzorky DPK)
3. Vzorek změříme ve flow cytometru.
4. Analyzujeme na protokolu CD45FITC – CD34PE – 7AAD UCB.pro (vytvořená gatovací strategie).

Výsledky nativních i zmražených vzorků byly analyzovány v programu Kaluze Flow Cytometry Analysis v1.1.

6.3 Optimalizace metody kultivace před zamražením

6.3.1 Krátkodobá kultivace hematopoetických progenitorů (CFU-GM) z dárcovské pupečnickové krve před zamražením

Princip:

Kultivace pupečnickové krve třemi metodami má ověřit a zjistit, která z použitých metod je nejvhodnější pro kultivaci pupečnickové krve před zamražením.

Cíl:

Deset vzorků dárcovské pupečnickové krve bylo kultivováno třemi různými metodami.

Limity parametrů procesu:

- Transplantát bez záchyty mikrobiální kontaminace
- Schopnost krevních progenitorových buněk tvořit kolonie
- Průkaznost nejvhodnější metody pro kultivaci pupečnickové krve před zamražením (největší množství dobře rozpoznatelných kolonií – nejlépe odečitatelné a jasně identifikovatelné kolonie)

I. Kultivační metoda

Princip:

Z vyšetření krevního obrazu na analyzátoru dostaneme koncentraci leukocytů ve vyšetřované suspenzi – WBC [1×10^6 /ml]. Vzorek naředíme tak, abychom dostali buněčnou suspenzi obsahující 5×10^5 WBC v 500 μ l. Když 300 μ l této suspenze přidáme do 3 ml Methocultu, budeme v 1 kultivační misce kultivovat 1×10^5 leukocytů na výskyt kolonie tvořících progenitorových buněk.

Výskyt kolonií se hodnotí po 14 dnech kultivace. Zpětným výpočtem pak dostaneme koncentraci jednotlivých typů kolonie tvořících progenitorových buněk ve vyšetřovaném vzorku. Metoda vychází z kultivace vzorků BM a PBSC před zamražením.

Materiál:

Reagencie a roztoky

- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Stem Cell Technologies Inc.
- Methocult GF 4434, Stem Cell Technologies Inc.
- Fluorescenční činidlo pro vitalitu, Lékarna
- Sterilní voda, PAN

Spotřební materiál

- Sterilní zkumavka 10 ml s červenou zátkou, Dispolab
- Injekční jehla, Braun
- Injekční stříkačka 2 ml, Braun
- Kultivační miska \varnothing 35 mm, Nunc
- Petriho miska \varnothing 14 cm, Nunc
- Pipeta pasteurova nesterilní 3 ml
- Alkohol 70%
- Sterilní komprese gázy
- Sterilní rouška 40x60 cm, Dina-Hitex
- Sterilní rukavice
- Sterilní špičky

Přístroje

- Box s laminárním prouděním
- Vortex
- Automatické pipety
- Inkubátor
- Mikroskop inverzní – Olympus

Pracovní postup:

1. Z pupečnickové krve se odebere 1 ml buněčné suspenze do sterilní zkumavky, z něhož změníme krevní obraz. Zjistíme tak hodnotu WBC [1×10^6 /ml].
2. Z hodnoty WBC vypočítáme množství suspenze obsahující 1×10^5 leukocytů:

$$V_1 [\mu\text{l}] = 10500/\text{WBC}$$

$$V_2 [\mu\text{l}] = V_1/21$$

Získaná hodnota V_1 se dělí 21 (21x ředění albuminem), jelikož v případě pupečnickové krve nejde o koncentrát získaný ze separátoru, pro něhož byl vzoreček připraven. DPK obsahuje erytrocyty.

V_1 – Pomocná hodnota pro konečný výpočet nasazeného objemu PK [μl]

V_2 – Celkové množství nasazeného objemu PK [μl]

10500 – Podrobný postup výpočtu je uveden v příloze 3

WBC – Hodnota WBC z krevního obrazu PK před zamražením [$1 \times 10^6/\text{ml}$]

3. Vypočítaný objem suspenze doplníme do 500 μl IMDM.
4. Z této suspenze odpipetujeme 300 μl do zkumavky se 3 ml Methocultu a promícháme.
5. Do zkumavky vložíme 2 ml stříkačku s růžovou jehlou a necháme stát asi 30 minut.
6. Poté natáhneme do stříkačky Methocult – cca 2,4 ml a rozdělíme jej po 1,1 ml na dvě označené kultivační misky⁷. Krouživým pohybem je médium s buňkami rovnoměrně rozprostřeno po dně misky – je třeba zajistit stejnou výšku média v misce, protože v opačném případě dochází na místě s menším množstvím média k rychlejšímu vysychání. Na jednu misku tedy připadá 1×10^5 leukocytů.
7. Kultivační misky uzavřeme a vložíme spolu s miskou se sterilní vodou do označené Petriho misky⁸ a necháme kultivovat v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 100% vlhkost). Je třeba zabránit prudkým pohybům s miskou, které mohou vést k porušení celistvosti vznikajících kolonií. Případný úbytek sterilní vody ve třetí misce doplňujeme, abychom zabránili vysychání média.
8. Kultivaci hodnotíme po 14 – 16 dnech pomocí inverzního mikroskopu.
9. Počet kolonií ve štěpu vypočteme:

⁷ Misky označíme římskou číslicí I. nebo II., kódem DPK, „před zamražením“.

⁸ Petriho misku označíme kódem DPK, „před zamražením“ a datem odečtu kultivace.

$M_{I.} + M_{II.}$	×	Celkový zamr.objem DPK
2		100
$M_{I.}$ = miska I. $M_{II.}$ = miska II.		

II. Kultivační metoda (metoda s lýzí erytrocytů)

Princip:

Z vyšetření krevního obrazu na analyzátoru dostaneme koncentraci leukocytů ve vyšetřované suspenzi - WBC [$1 \times 10^6/\text{ml}$]. Vzorek pupečnickové krve 20krát naředíme NH_4Cl (chloridem amonným), čímž spustíme lýzu erytrocytů. Suspenzi stočíme, odsraníme supernatant a poté vzorek (pellet) naředíme tak, abychom dostali buněčnou suspenzi obsahující 5×10^5 WBC v 500 μl . Když 300 μl této suspenze přidáme do 3 ml Methocultu, budeme v 1 kultivační misce kultivovat 1×10^5 leukocytů na výskyt kolonie tvořících progenitorových buněk.

Výskyt kolonií se hodnotí po 14 dnech kultivace. Zpětným výpočtem pak dostaneme koncentraci jednotlivých typů kolonie tvořících progenitorových buněk ve vyšetřovaném vzorku.

Materiál:

Viz 1. kultivační metoda

- Chlorid amonný - NH_4Cl

Pracovní postup:

1. Z pupečnickové krve se odebere 1 ml buněčné suspenze do sterilní zkumavky a z krevního obrazu zjistíme hodnotu WBC [$1 \times 10^6/\text{ml}$].
2. Z hodnoty WBC vypočítáme množství suspenze obsahující 1×10^5 leukocytů (viz I. kultivační metoda):

$$V_1 [\mu\text{l}] = 10500/\text{WBC}$$

$$V_2 [\mu\text{l}] = V_1/21$$

3. Z objemu V_2 vypočítáme množství NH_4Cl , které přidáme ke vzorku o objemu V_2 a spustíme tak lýzu erytrocytů. Centrifugujeme (500 g, 10 min, 20°C).

$$V_{\text{NH}_4\text{Cl}} [\mu\text{l}] = V_2 \times 20$$

$V_{\text{NH}_4\text{Cl}}$ – Množství NH_4Cl , které přidáme ke vzorku PK a spustíme tak lýzu erytrocytů

V_2 – Celkové množství nasazeného objemu PK [μl]

20 – Koeficient pro lýzu erytrocytů

4. Po centrifugaci odtáhneme supernatant a buněčnou suspenzi (pellet) doplníme do 500 μl IMDM a promícháme na vortexu.
5. Z této suspenze odpipetujeme 300 μl do zkumavky se 3 ml Methocultu a promícháme.
6. Do zkumavky vložíme 2 ml stříkačku s růžovou jehlou a necháme stát asi 30 minut.
7. Poté natáhneme do stříkačky Methocult – cca 2,4 ml a rozdělíme jej po 1,1 ml na dvě označené kultivační misky.
8. Kultivační misky uzavřeme a vložíme je spolu s miskou se sterilní vodou do označené Petriho misky a necháme kultivovat v inkubátoru (37 °C, 5% CO_2 , 100% vlhkost).
9. Kultivaci hodnotíme po 14 – 16 dnech pomocí inverzního mikroskopu.
10. Počet kolonií ve štěpu vypočteme:

$M_{\text{I.}} + M_{\text{II.}}$	×	Celkový zamr.objem DPK
-----		-----
2		100
$M_{\text{I.}}$ = miska I.		
$M_{\text{II.}}$ = miska II.		

III. Kultivační metoda

Princip:

Metoda vychází z kultivační metody pro dárcovskou pupečnickovou krev po rozmražení, kdy se nasazuje 60 μl vzorku do 440 μl IMDM. Vzhledem k tomu, že objem PK po odběru je poloviční ve srovnání s celkovým zamraženým objemem PK, bylo v kultivaci před kryokonzervací nasazeno 30 μl PK.

Materiál:

Viz 1. kultivační metoda

Pracovní postup:

1. Z pupečnickové krve se odebere 1 ml buněčné suspenze do sterilní zkumavky a z krevního obrazu zjistíme hodnotu WBC [$1 \times 10^6/\text{ml}$].
2. Do zkumavky napipetujeme 470 μl IMDM a přidáme 30 μl vzorku PK, promícháme na vortexu.
3. Z této suspenze odpipetujeme 300 μl do zkumavky se 3 ml Methocultu a promícháme.
4. Do zkumavky vložíme 2 ml stříkačku s růžovou jehlou a necháme stát asi 30 minut.
5. Poté natáhneme do stříkačky Methocult – cca 2,4 ml a rozdělíme jej po 1,1 ml na dvě označené kultivační misky.
6. Kultivační misky uzavřeme a vložíme do Petriho misky a necháme kultivovat v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 100% vlhkost).
7. Kultivaci hodnotíme po 14 dnech pomocí inverzního mikroskopu.
8. Počet kolonií ve štěpu vypočteme:

$M_{\text{I.}} + M_{\text{II.}}$		Celkový zamr.objem DPK
-----	×	-----
2		100
$M_{\text{I.}}$ = miska I.		
$M_{\text{II.}}$ = miska II.		

Zhodnocení výsledků kultivací:

I. kultivační metoda

U všech 10 kultivovaných vzorků DPK byl jasný, dobře rozpoznatelný nález kolonií CFU-GM, BFU-E i CFU-GEMM. Kolonie byly dobře identifikovatelné a odečitatelné. Nebyla zde zachycena žádná mikrobiální kontaminace. Médium bylo čisté, místy mírně zrnité. Danou kultivační metodou byl vždy zachycen nejvyšší počet kolonií.

II. kultivační metoda

U všech vzorků DPK byl viditelný nárůst kolonií, ale v menší míře než u první kultivační metody. Medium bylo čisté, bez „zrn“ a kolonie se velmi dobře odečítaly. Žádný ze vzorků nebyl kontaminován.

III. kultivační metoda

U všech vzorků byl viditelný nárůst kolonií, avšak kolonie zde byly zastoupeny v nejmenším počtu ze všech tří kultivačních metod před zamražením. Médium však bylo mírně zrnité a kolonie se tak hůře odečítaly. Ani zde nebyl žádný ze vzorků kontaminován.

Závěr:

Z výsledků kultivace jasně vyplynulo, že nejlepší kultivační metodou PK před zamražením je I. kultivační metoda. Tato metoda byla dále používána ke kultivaci 40 vzorků DPK před zamražením.

7. Výsledky

Získané výsledky jsou rozděleny do tří částí:

- Stanovení nejvhodnější metody pro kultivaci pupečnickové krve před zamražením
- Měření exprese znaků CD34⁺ na živých leukocytech PK
- Porovnání naměřených hodnot s demografickými údaji o matce a dítěti

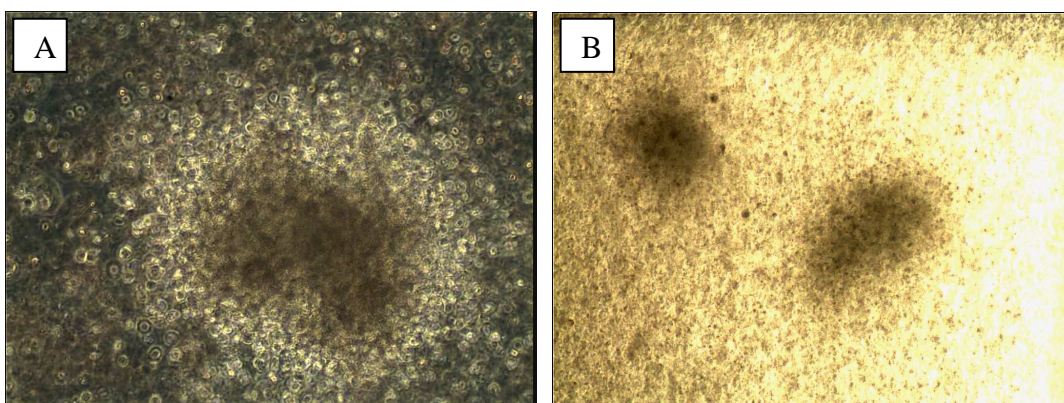
7.1 Optimalizace – Kultivace pupečnickové krve před zamražením třemi metodami

Kultivace PK před zamražením byla provedena u 10 vzorků DPK třemi metodami (viz 6.3).

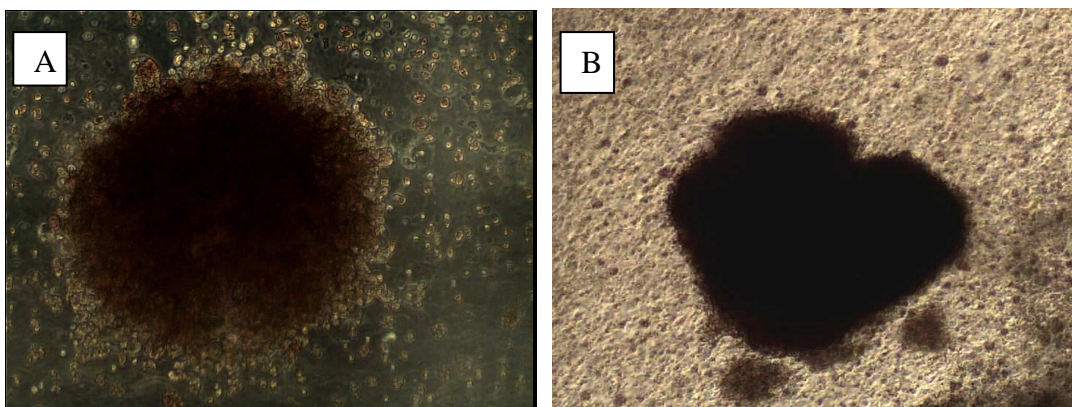
Hodnoty získané pomocí 3. kultivační metody vykazovaly nejnižší schopnost krevních progenitorových buněk tvořit kolonie, proto byla tato metoda, jejíž obdoba je v laboratoři používána pro kultivaci PK po rozmražení, vyhodnocena jako nevhodná pro kultivaci PK před zamražením. Zbývající dvě metody vykazovaly velmi podobné výsledky. U žádné nedošlo k výskytu mikrobiální kontaminace. Kolonie byly jasně identifikovatelné a dobře odečitatelné s výjimkou horšího odečtu a identifikace kolonií u 3 vzorků 2. kultivační metody. Schopnost krevních progenitorů tvořit kolonie byla u obou metod srovnatelná, s tím, že u 1. metody byly vždy počty kolonií nejvyšší.

Na základě získaných výsledků byla jako nejvhodnější metoda pro kultivaci PK před zamražením zvolena 1. kultivační metoda.

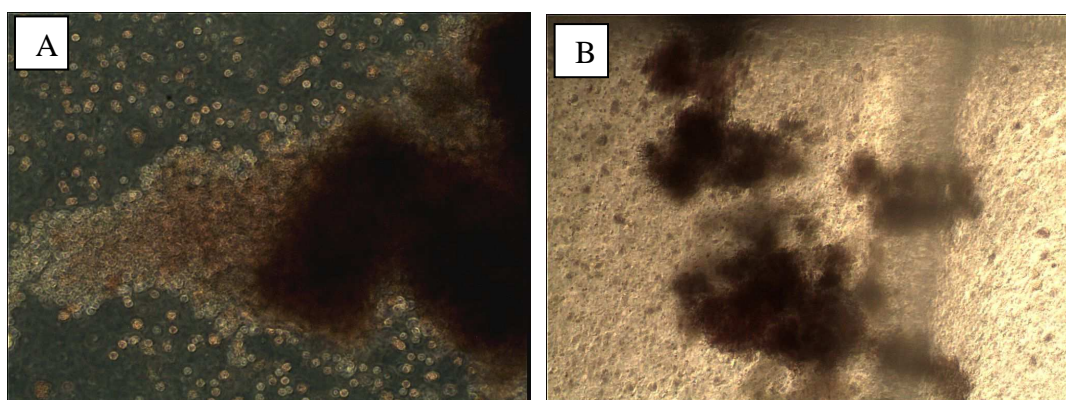
Fotky z jednotlivých kultivačních metod před zamražením:



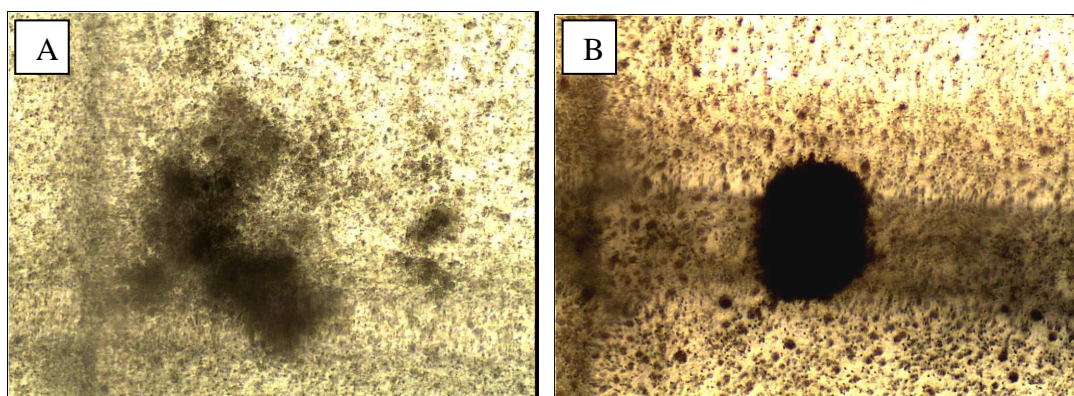
Obrázek 4: (A) Kolonie CFU-GM před kryokonzervací (1.kultivační metoda); (B) Dvě kolonie CFU-GM před z kryokonzervací (1. kultivační metoda)



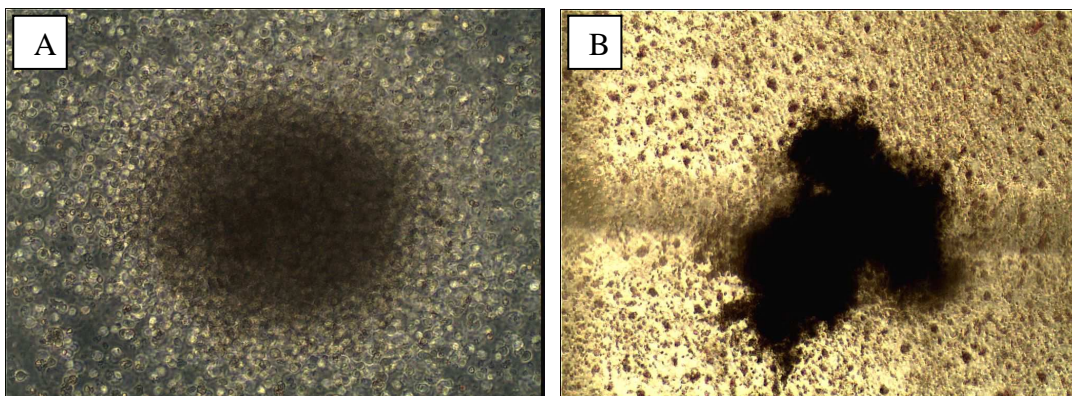
Obrázek 5: (A, B) Kolonie BFU-E před kryokonzervací (I. kultivační metoda)



Obrázek 6: (A, B) Kolonie CFU-GEMM před kryokonzervací (I. kultivační metoda)



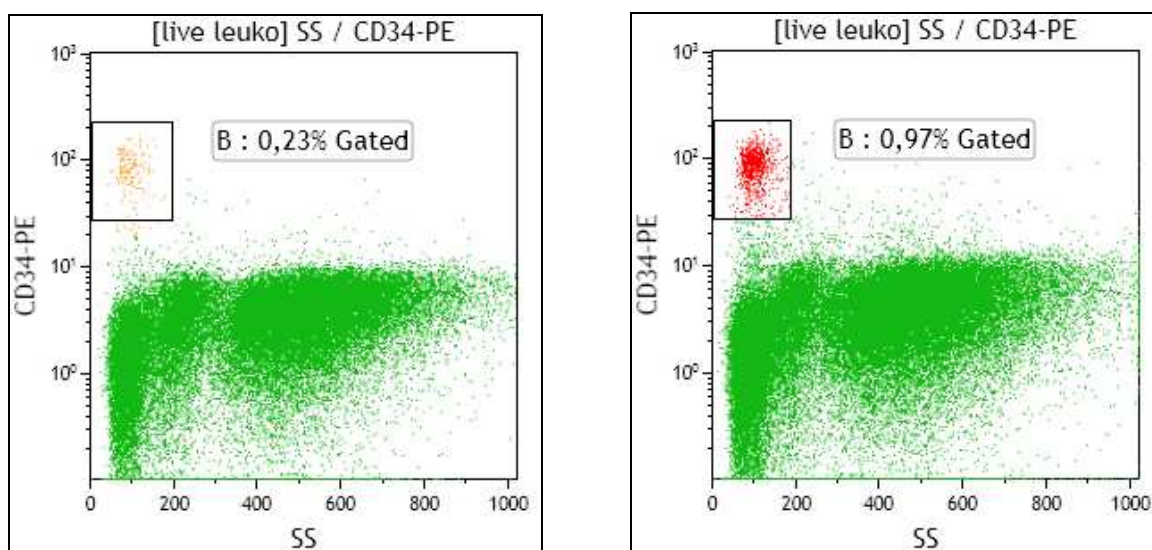
Obrázek 7: (A) Kolonie CFU-GM před kryokonzervací (II. kult.metoda); (B) Kolonie BFU-E před kryokonzervací (II. kult.metoda)



Obrázek 8: (A) Kolonie CFU-GM před kryokonzervací (III. kultivační metoda); (B) Kolonie BFU-E před kryokonzervací (III. kultivační metoda)

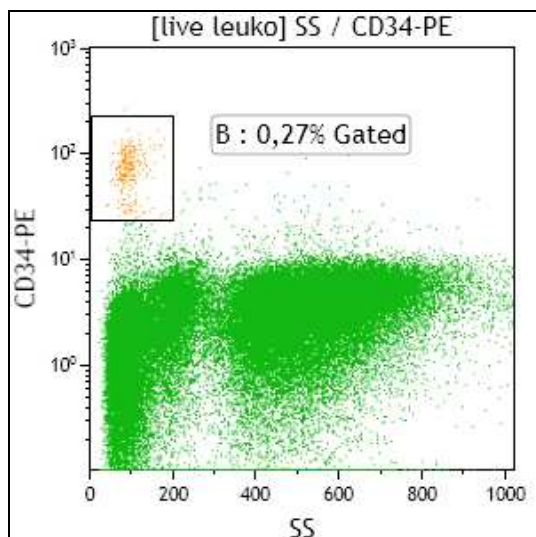
7.2 Měření exprese znaků CD34⁺ na živých leukocytech PK

K flowcytometrické analýze byl použit přístroj Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter) se software CXP. Vzorky byly analyzovány na konkrétním panelu sestaveného z jednotlivých protokolů při vhodném průtoku (300-500 events/sec).

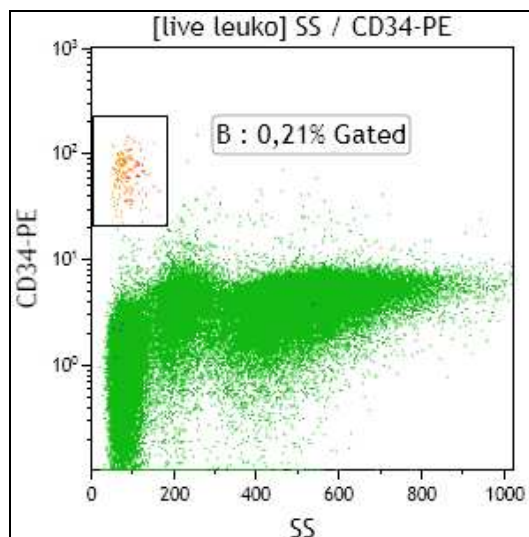


a)

b)



c)



d)

Histogramy a), b), c), d): Gating $CD34^+$ buněk na živých leukocytech (ukázky histogramů), Gating $CD34^+$ buněk na histogramu $CD34^+PE$ vs. SS. Zeleně je značena populace živých leukocytů. Žlutě / červeně živé leukocyty nesoucí znak $CD34^+$.

7.3 Porovnání naměřených hodnot s demografickými údaji o matce a dítěti a vyvození hlavních trendů

K následným analýzám byly použity výsledky zpracování a měření 50 štěpů dárcovské PK. Pro lepší srovnání ztrát, popřípadě nárůstu hodnot mezi vzorky před a po kryokonzervaci, byly naměřené hodnoty u PK po rozmražení přepočítány na stejný objem PK použitý u vzorků před zamražením, tedy na poloviční hodnoty. U naměřených hodnot se sledovalo, do jaké míry jsou ovlivněny jednotlivými demografickými údaji o matce a dítěti, které byly získány z průvodní dokumentace o odběru dárcovské PK.

V dané dokumentaci byly vždy vyplněny následující údaje:

O matce: rok narození, etnikum, místo narození, krevní skupina, minulá těhotenství a počet dětí.

O dítěti: pohlaví, den narození, krevní skupina, popřípadě porodní komplikace.

O odebrané PK: den odběru, hodina odběru, místo odběru, popřípadě komplikace s odběrem PK.

Vzhledem k tomu, že v této studii byly všechny rodičky a tedy dárkyně PK stejného etnika, nebyl tento parametr zahrnut do srovnávacích analýz.

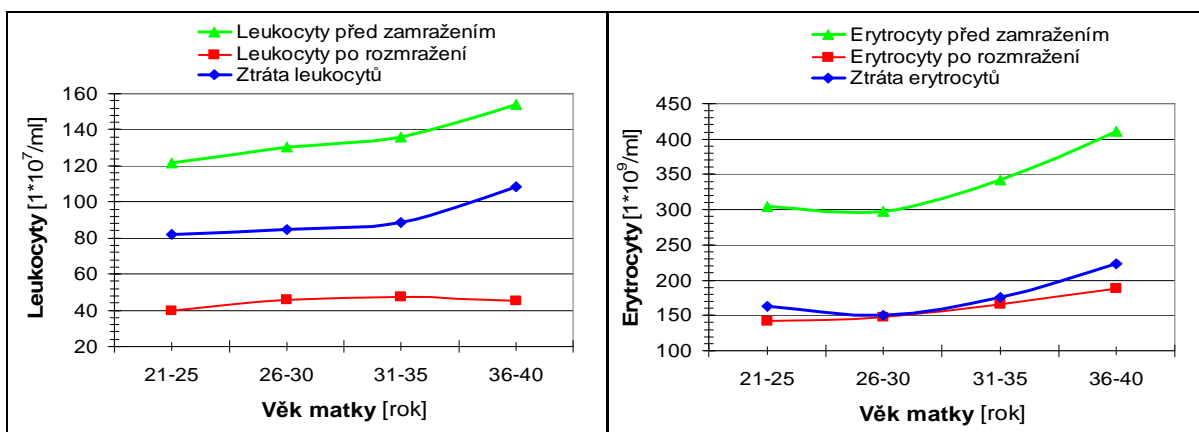
Do analýzy podle pohlaví dítěte bylo zahrnuto pouze 45 DPK, neboť u zbylých 5 nebylo pohlaví dítěte v průvodní dokumentaci uvedeno.

7.3.1 Analýza podle věku matky

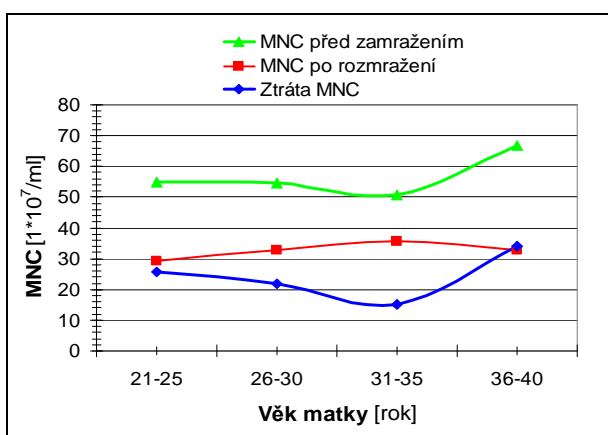
Změna krevního obrazu před a po rozmražení

Z naměřených hodnot je patrné, že v odebrané PK dochází s přibývajícím věkem matky k postupnému zvyšování počtu všech buněk – leukocytů, erytrocytů a MNC (monocyty a lymfocyty) (viz grafy 1, 2, 3). U MNC je však mezi 31. a 35. rokem u matky zaznamenán nepatrný pokles v počtu buněk. Po 35. roce se však počet MNC v PK opět zvyšuje.

Po rozmražení byly zaznamenány největší ztráty u leukocytů (v průměru 67%). V případě erytrocytů byly ztráty 53% a u MNC 43%.



Graf 1, 2: Vlevo - Průměrné hodnoty leukocytů v závislosti na věku matky; Vpravo - Průměrné hodnoty erytrocytů v závislosti na věku matky

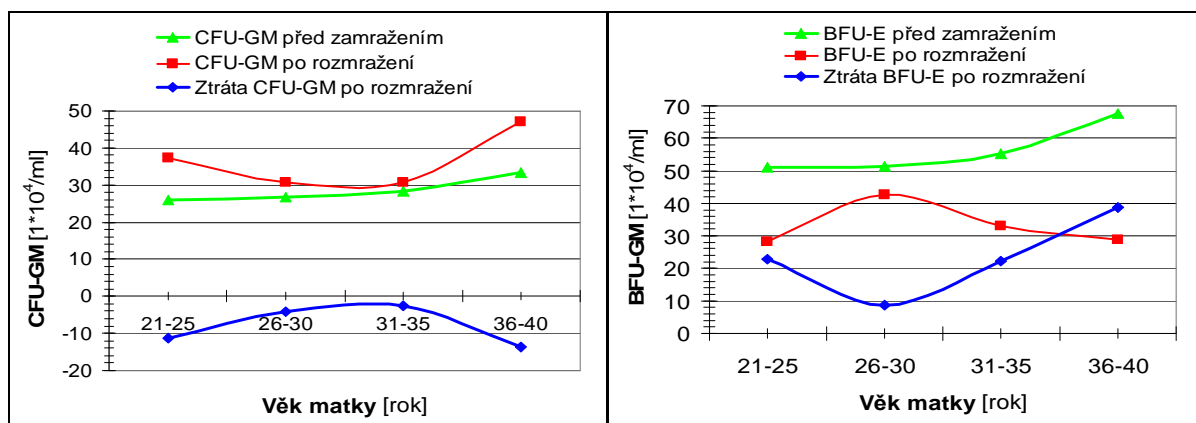


Graf 3: Průměrné hodnoty MNC v závislosti na věku matky

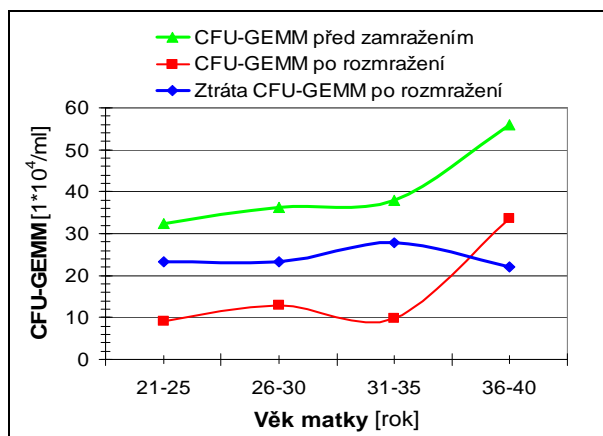
Změna počtu hematopoetických progenitorů před a po rozmražení

Se zvyšujícím se věkem matky také stoupá počet všech hematopoetických kolonií (CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM) v odebrané PK, přičemž k nejvýraznějšímu nárůstu dochází po 35. roku matky (viz grafy 4, 5, 6).

Po rozmražení v PK narůstají počty kolonií CFU-GM v průměru o 28%. Naopak, v linii CFU-GEMM došlo vlivem kryokonzervace k 60% ztrátám. U BFU-E byly nejmenší ztráty mezi 26. – 30. rokem matky, pouze 17%.



Graf 4, 5: Vlevo – Průměrné hodnoty CFU-GM v závislosti na věku matky; Vpravo – Průměrné hodnoty BFU-E v závislosti na věku matky

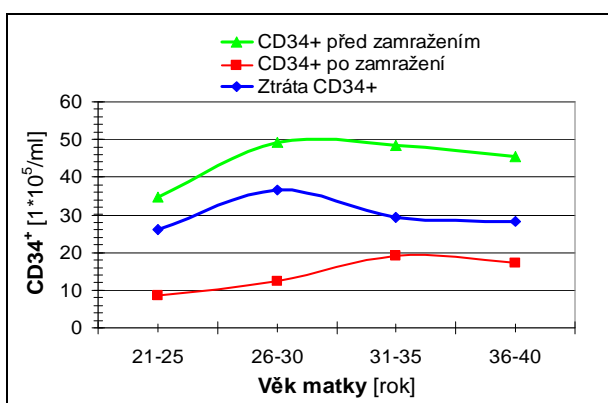


Graf 6: Průměrné hodnoty CFU-GEMM v závislosti na věku matky

Změna počtu buněk CD34⁺ před a po rozmražení

V odebrané PK je zachycen největší počet CD34⁺ buněk mezi 26. – 35. rokem rodičky (graf 7). Naopak nejméně výtěžné PK jsou ty, kde byl věk matky v intervalu 21 – 25 let.

Nejvýraznější ztráty CD34⁺ buněk po kryokonzervaci jsou zaznamenány mezi 21. – 35. rokem rodičky (70%), s vrcholem kolem 26. – 30. roku.



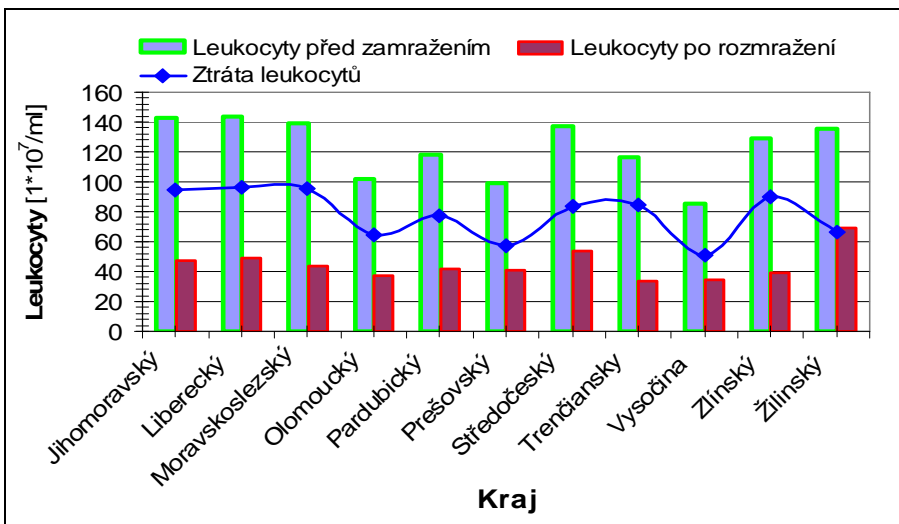
Graf 7: Průměrné hodnoty CD34⁺ v závislosti na věku matky

7.3.2 Analýza podle místa narození matky

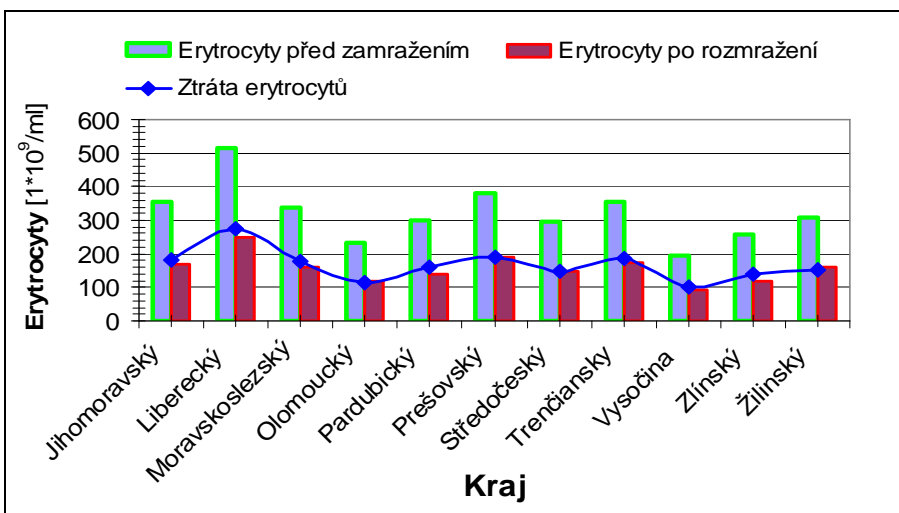
Změny krevního obrazu před a po rozmražení

Podle tohoto parametru jsou z hlediska leukocytů nejméně výtěžné pupečnickové krve, pokud matka pocházela z Vysočiny, Prešovského či Olomouckého kraje (graf 8). Kryokonzervací však dochází k vysokým ztrátám leukocytů (v průměru 64%) ve všech skupinách a ve výsledku jsou tak hodnoty leukocytů mezi jednotlivými kraji podobné, s výjimkou kraje Žilinského, kde hodnoty leukocytů zůstávají i nadále nejvyšší.

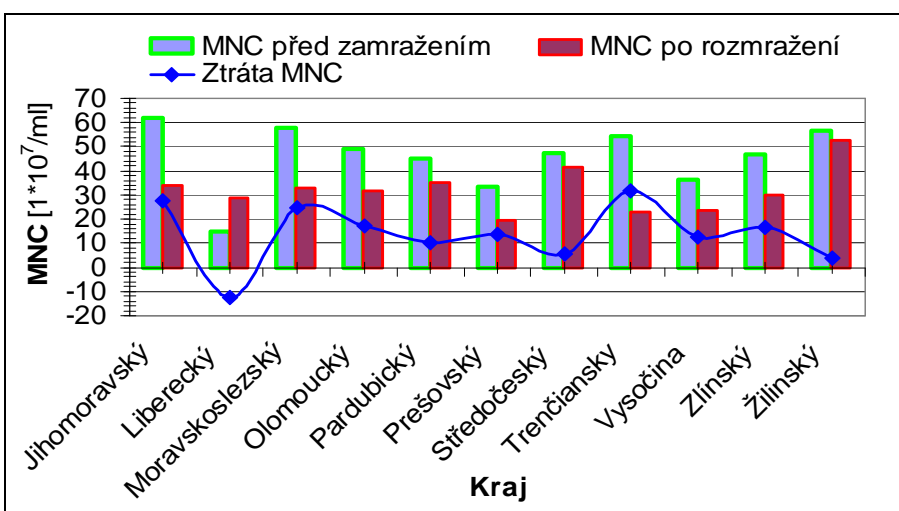
V případě erytrocytů jsou nejvyšší počty u PK tam, kde matka pochází z Libereckého kraje a u MNC z kraje Jihomoravského, popř. Moravskoslezského či Žilinského (grafy 9, 10). Kryokonzervací vznikají ztráty i u těchto buněk (v průměru u erytrocytů – 52%, u MNC 30%) a to ve všech krajích, s výjimkou MNC u Libereckého kraje, kde došlo k nárůstu buněk.



Graf 8: Průměrné hodnoty leukocytů v závislosti na místě narození matky



Graf 9: Průměrné hodnoty erytrocytů v závislosti na místě narození matky



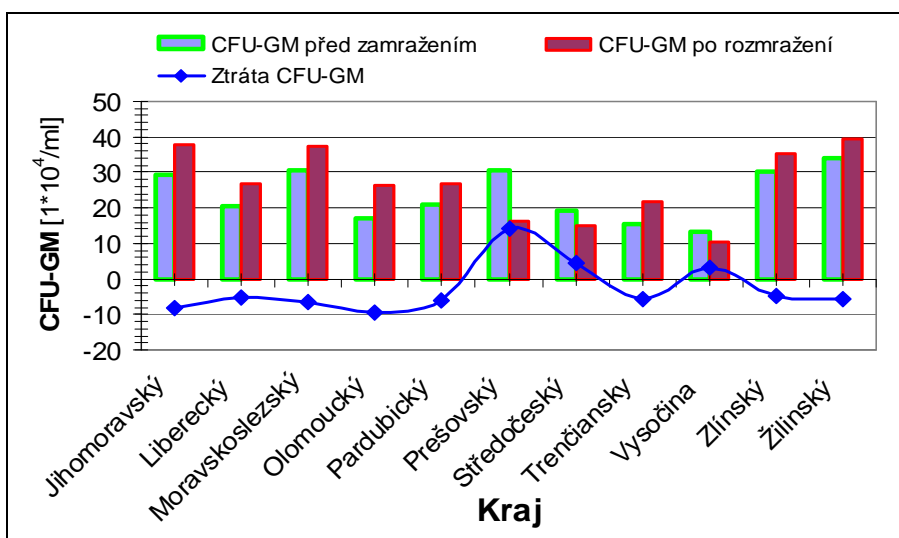
Graf 10: Průměrné hodnoty MNC v závislosti na místě narození matky

Změny počtu kolonií před a po rozmražení

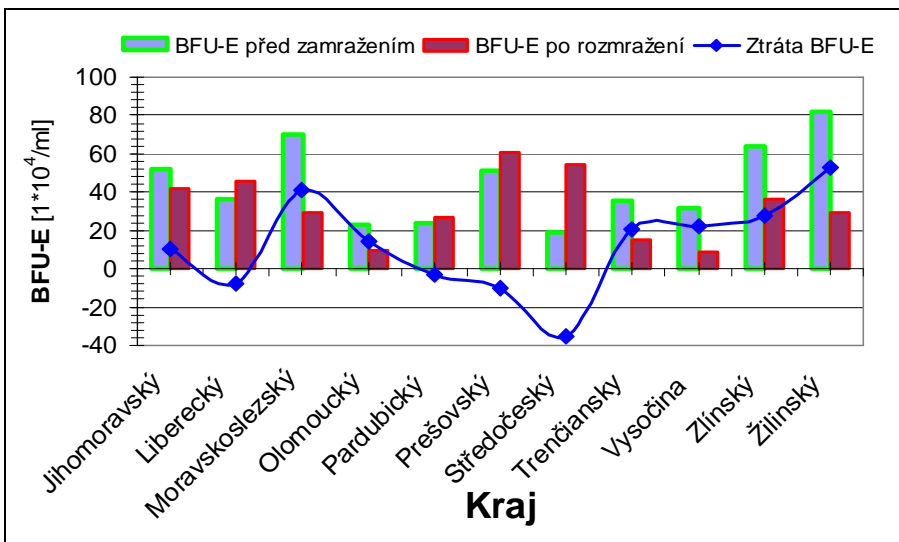
Nejvyšší množství CFU-GM kolonií před i po rozmražení najdeme u PK, pokud se matka narodila v Jihomoravském, Moravskoslezském, Zlínském či Žilinském kraji (graf 11). Po rozmražení opět dochází u vzorků ke zvýšení počtu kolonií CFU-GM, s výjimkou krajů Prešovského, Středočeského a Vysočiny. Průměrný nárůst těchto kolonií činí 11%.

Co se týče BFU-E najdeme největší množství u pupečnickových kreví, pokud se matka narodila v kraji Zlínském, Žilinském a Moravskoslezském (graf 12). Po kryokonzervaci se stávají nejvýtežnějšími kraji, co do počtu kolonií BFU-E, Prešovský a Středočeský kraj. Ztráta v této buněčné řadě je 27% v průměru.

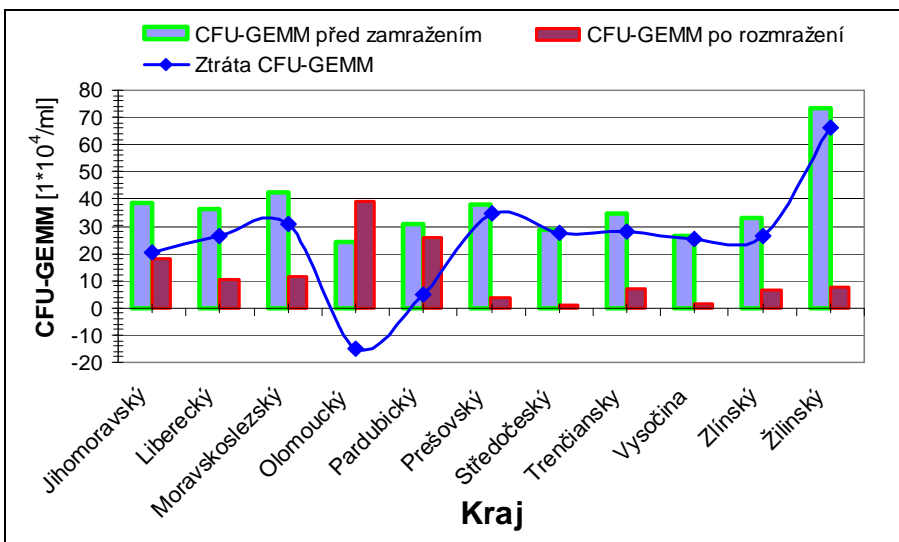
Jednoznačně nejvyšší hodnoty CFU-GEMM najdeme v PK s místem rodiště matky v Žilinském kraji. Po kryokonzervaci dochází k citelným ztrátám (68% v průměru) ve všech krajích, výjimku tvoří PK z Olomouckého kraje, kde je po rozmražení patrné navýšení počtu těchto kolonií (graf 13).



Graf 11: Průměrné hodnoty CFU-GM v závislosti na místě narození matky



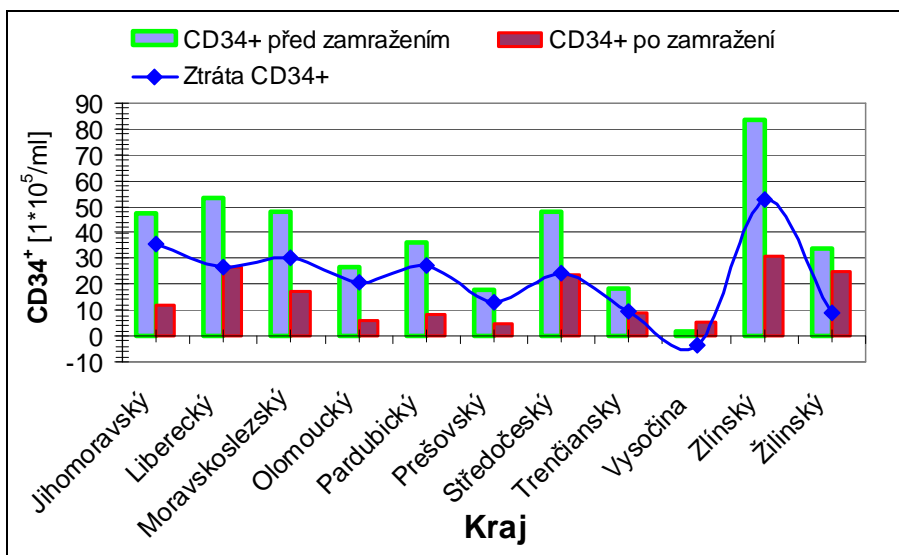
Graf 12: Průměrné hodnoty BFU-E v závislosti na místě narození matky



Graf 13: Průměrné hodnoty CFU-GEMM v závislosti na místě narození matky

Změny v počtu CD34⁺ buněk před a po rozmražení

CD34⁺ buňky jsou nejvíce zastoupeny v PK u matek s rodištěm ve Zlínském kraji (graf 14). Po kryokonzervaci jsou nejvýběžnější PK nejen ze Zlínského kraje, ale také Středočeského, Libereckého a Žilinského. Naopak nejhorší výsledky jsou patrné u kraje Olomouckého, Pardubického, Prešovského a obzvláště u Vysočiny. Celkové ztráty po rozmražení byly 59%.



Graf 14: Průměrné hodnoty CD34⁺ v závislosti na místě narození matky

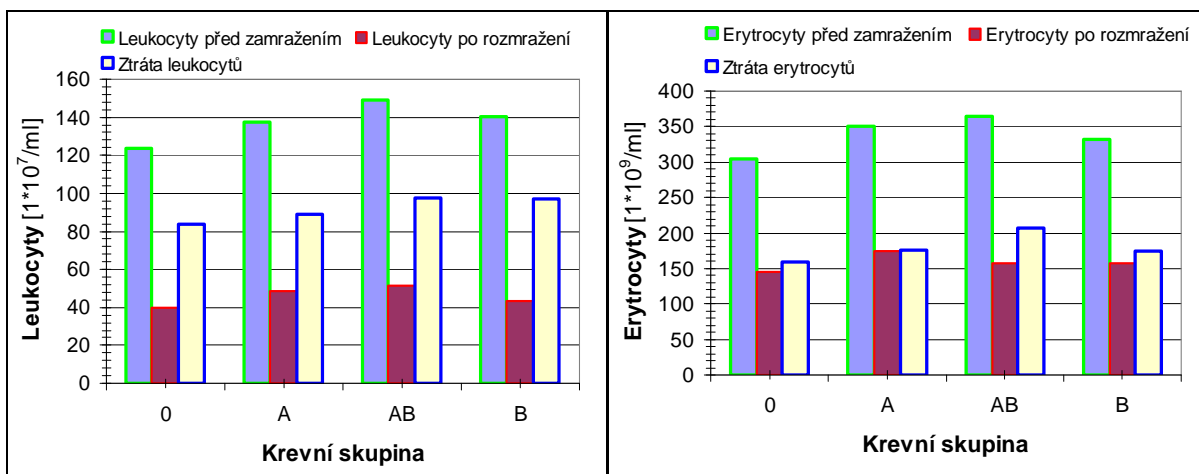
Jak se dalo předpokládat, místo narození matky nemá vliv na buněčnost štěpu. Zajímavostí však zůstává fakt, že nejhorší výsledky byly dosaženy u PK z kraje Vysočina.

7.3.3 Analýza podle krevní skupiny matky

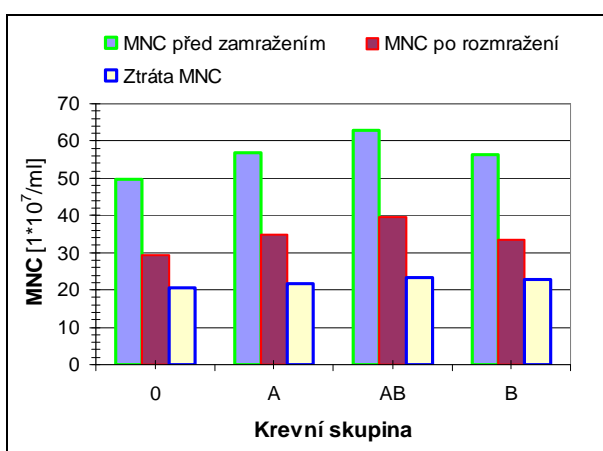
Změny krevního obrazu před a po rozmražení

U leukocytů a erytrocytů nejsou významné rozdíly mezi jednotlivými krevními skupinami, ať už před nebo po kryokonzervaci (grafy 15, 16, 17). U MNC je zaznamenán nejvyšší počet buněk před i po rozmražením u KS AB.

Po kryokonzervaci jsou největší ztráty opět u leukocytů – až 67%. V případě erytrocytů jsou ztráty 53% a MNC 39%.



Graf 15, 16: Vlevo – Průměrné hodnoty leukocytů v závislosti na krevní skupině matky; Vpravo – Průměrné hodnoty erytrocytů v závislosti na krevní skupině matky



Graf 17: Průměrné hodnoty MNC v závislosti na krevní skupině matky

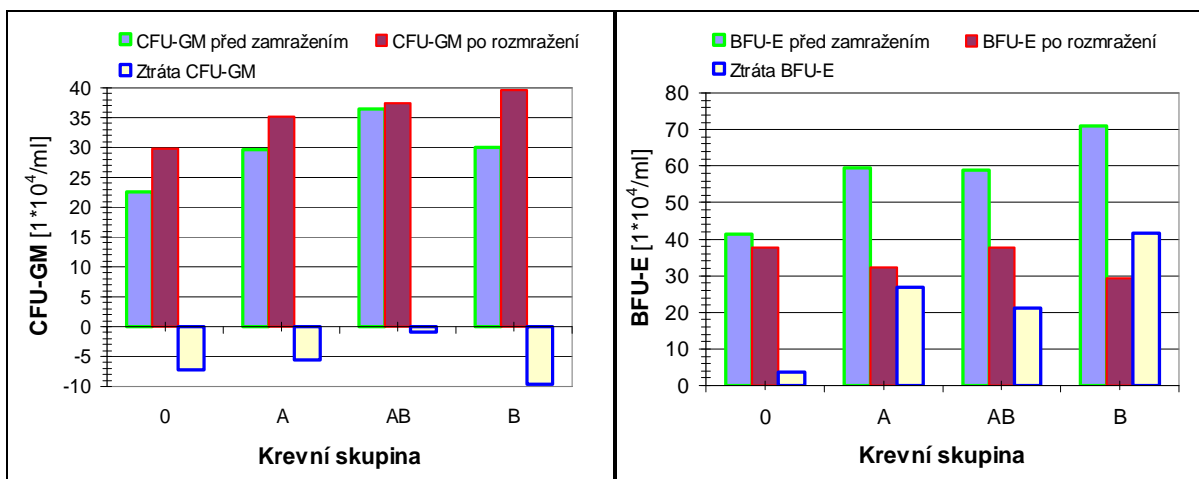
Změny počtu kolonií před a po rozmražení

Nejnižší hodnoty progenitorů CFU-GM najdeme u KS 0 a to před i po kryokonzervaci (graf 18). Po rozmražení je však opět zaznamenán nárůst těchto kolonií (průměrně o 20%) u všech krevních skupin.

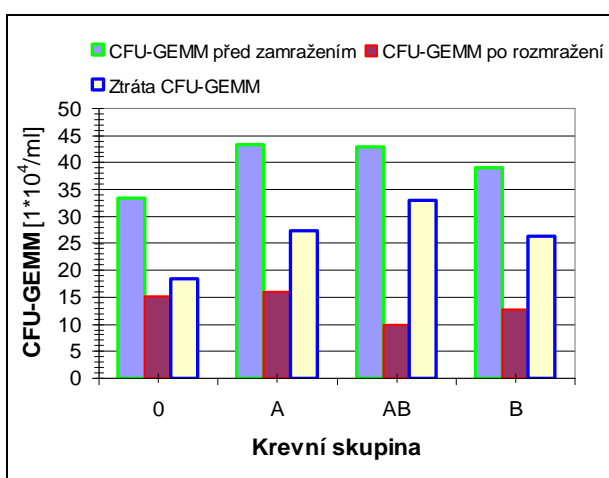
U progenitorů BFU-E je opět nejméně výtěžnou KS 0, ovšem pouze před kryokonzervací (graf 19). Po rozmražení naopak patří tato skupina, co do výtěžnosti BFU-E, k nejlepším spolu s KS AB.

Krevní skupina 0 je nejméně výtěžnou i u progenitorů CFU-GEMM. Po rozmražení je to však KS AB, neboť v této dochází až k 77% ztrátě (graf 20).

Průměrné ztráty u BFU-E činí 41% a CFU-GEMM 66%.



Graf 18, 19: Vlevo – Průměrné hodnoty CFU-GM v závislosti na krevní skupině matky; Vpravo – Průměrné hodnoty BFU-E v závislosti na krevní skupině matky

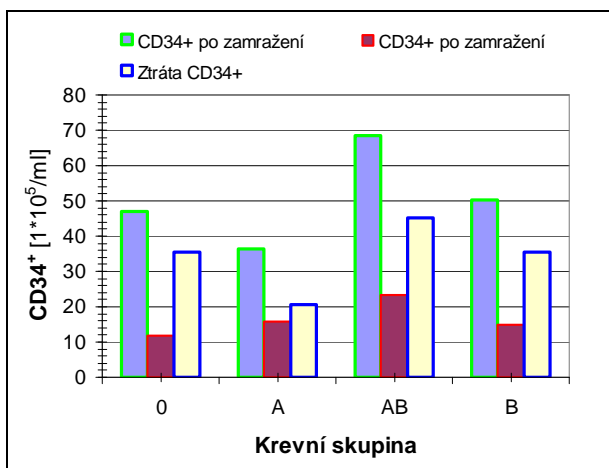


Graf 20: Průměrné hodnoty CFU-GEMM v závislosti na krevní skupině matky

Změny v počtu CD34⁺ buněk před a po rozmražení

Jednoznačně největší dávka CD34⁺ buněk je u krevní skupiny AB, hodnoty jsou až o 1/3 vyšší ve srovnání s ostatními KS (graf 21). Po rozmražení jsou ale u této KS zaznamenány vysoké ztráty – až 2/3, i nadále však zůstává nejužitečnější krevní skupinou.

Nejméně výtěžnou je i v tomto případě krevní skupina 0, ovšem pouze před kryokonzervací. Ztráty po rozmražení, které v průměru činí 68%, vyrovnávají naměřené hodnoty CD34⁺ buněk mezi krevními skupinami 0, A a B.



Graf 21: Průměrné hodnoty $CD34^+$ v závislosti na krevní skupině matky

Celkově lze označit za nejméně výtěžnou krevní skupinu 0, naopak nejvýtěžnější byla KS AB.

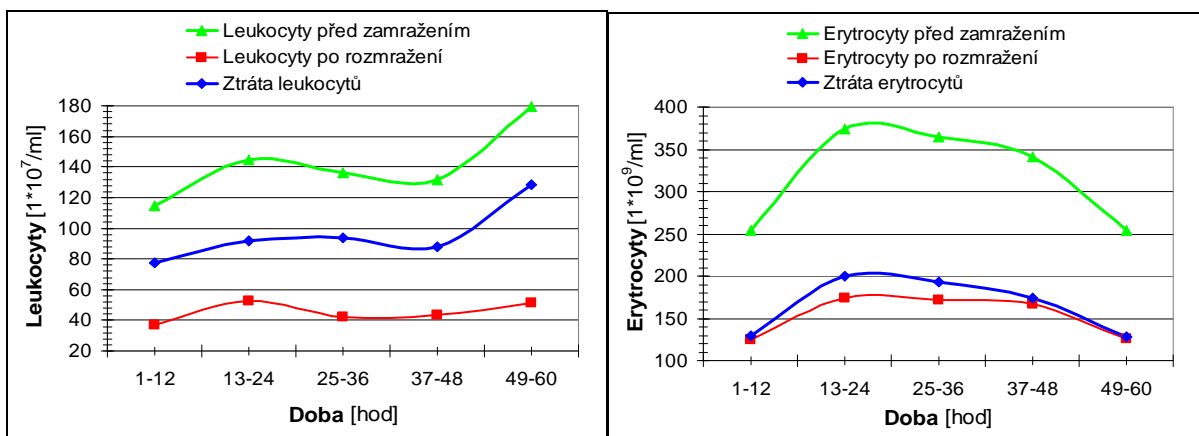
7.3.4 Analýza podle doby, která uběhla mezi odběrem a zpracováním DPK

Pupečnicková krev musí být zpracována do 48 hodin od jejího odběru, neboť po uplynutí této doby dochází k odumírání buněk a tedy snížení její výtěžnosti. Pokud dojde k překročení daného limitu, je PK zlikvidována.

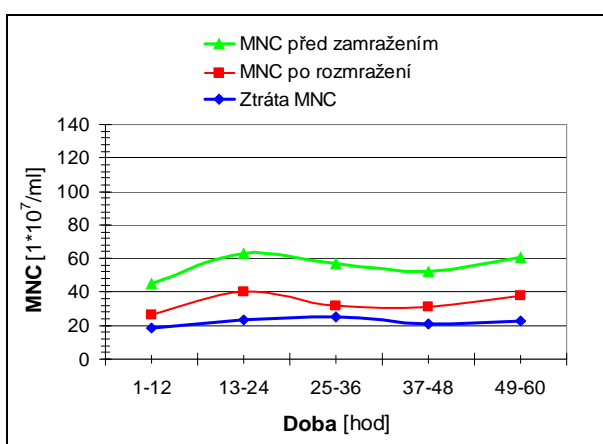
Z výsledků je však patrné, že u leukocytů, MNC, BFU-E a $CD34^+$ buněk dochází po 48. hodině k výraznému nárůstu počtu buněk (graf 22), což může být výjimečný jev, jelikož v této analýze překročily uvedený časový limit pouze dva vzorky. Abychom mohli vyvodit jednoznačné závěry, bylo by nutné provést rozsáhlejší studii tohoto jevu s větším počtem vzorků.

Změna krevního obrazu před a po rozmražení

S určitostí lze konstatovat, že největší dávka leukocytů, erytrocytů i MNC v PK je mezi 13. – 24. hodinou po jejím odběru (grafy 22, 23, 24). Po překročení této pomyslné časové hranice se množství buněk v PK snižuje. Kryokonzervací utrpí největší ztráty leukocyty – 68%, u erytrocytů je to 52% a u MNC 40%.



Graf 22, 23: Vlevo – Průměrné hodnoty leukocytů v závislosti na rozdílu času mezi odběrem a zpracováním; Vpravo – Průměrné hodnoty erythrocytů v závislosti na rozdílu času mezi odběrem a zpracováním



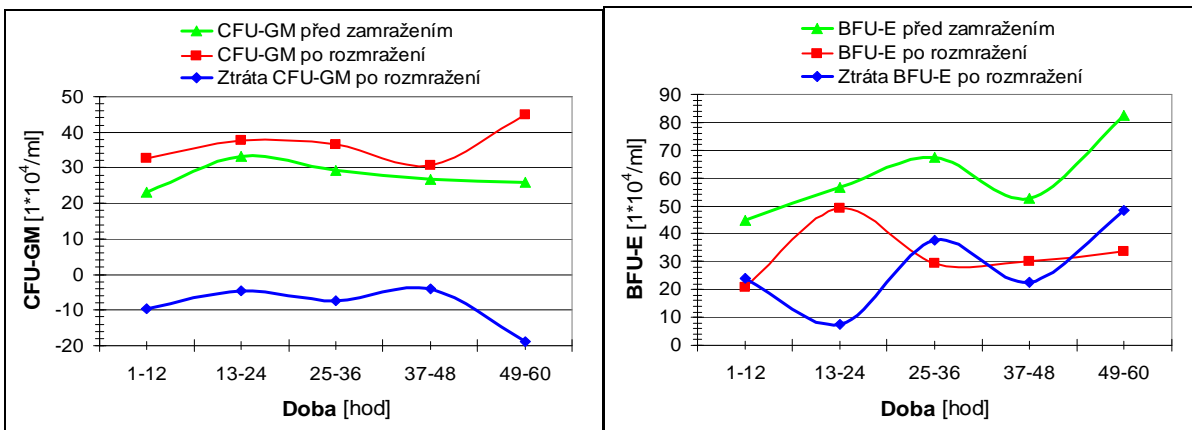
Graf 24: Průměrné hodnoty MNC v závislosti na rozdílu času mezi odběrem a zpracováním

Změna počtu kolonií před a po rozmražení

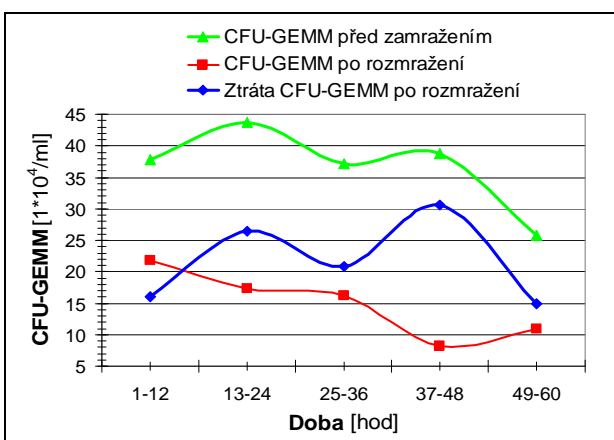
Progenitory CFU-GM a CFU-GEMM jsou v PK přítomny v největším množství mezi 13. – 24. hodinou po odběru. Poté dochází k jejich poklesu. (grafy 25, 27).

Naopak u progenitorových buněk BFU-E je dosaženo maxima mezi 25. – 36. hodinou (graf 26).

Po kryokonzervaci je u CFU-GM opět patrný nárůst v počtu kolonií po rozmražení – o 32%. Ztráty u BFU-E činily v průměru 46%, s tím, že k nejmenším ztrátám (13%) docházelo v rozmezí mezi 13. – 24. hodinou, u CFU-GEMM 60%.



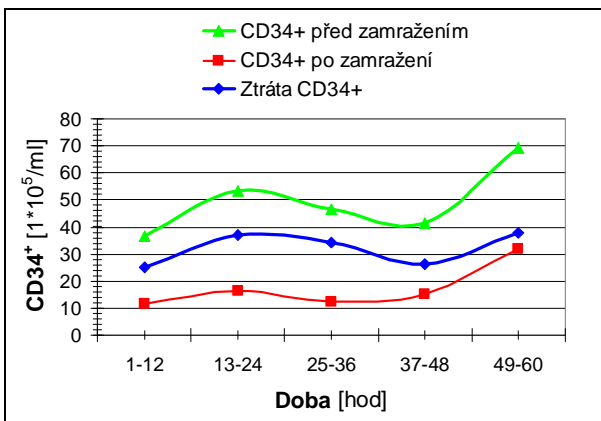
Graf 25, 26: Vlevo – Průměrné hodnoty CFU-GM v závislosti na rozdílů času mezi odběrem a zpracováním; Vpravo – Průměrné hodnoty BFU-E v závislosti na rozdílů času mezi odběrem a zpracováním



Graf 27: Průměrné hodnoty CFU-GEMM v závislosti na rozdílů času mezi odběrem a zpracováním

Změna počtu buněk CD34⁺ před a po rozmražení

Množství CD34⁺ buněk je v PK nejvyšší mezi 13. – 24. hodinou po odběru (graf 28). Poté opět dochází ke ztrátám buněk. Celkové ztráty, k nimž dochází během kryokonzervace, měly v průměru 65%.



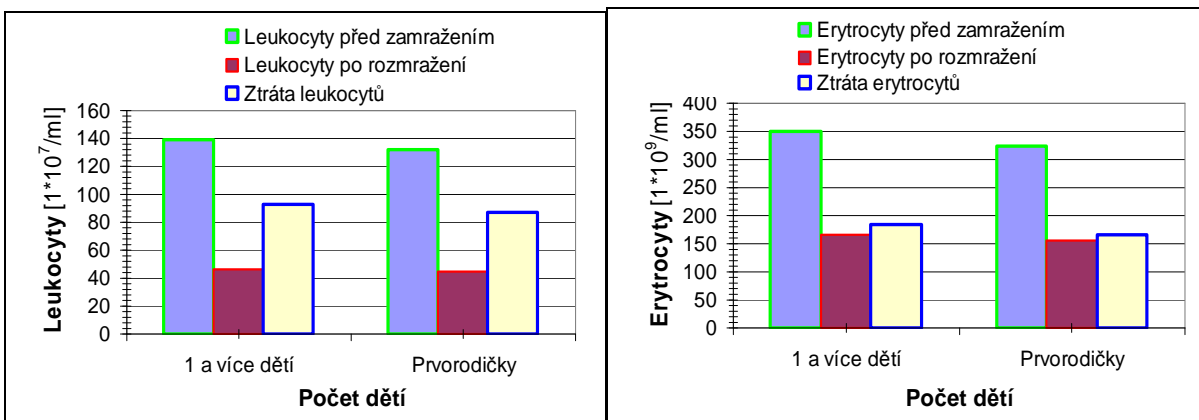
Graf 28: Průměrné hodnoty $CD34^+$ v závislosti na rozdílu času mezi odběrem a zpracováním

7.3.5 Analýza podle rozdílu mezi prvorodičkami a matkami s 1 a více dětmi

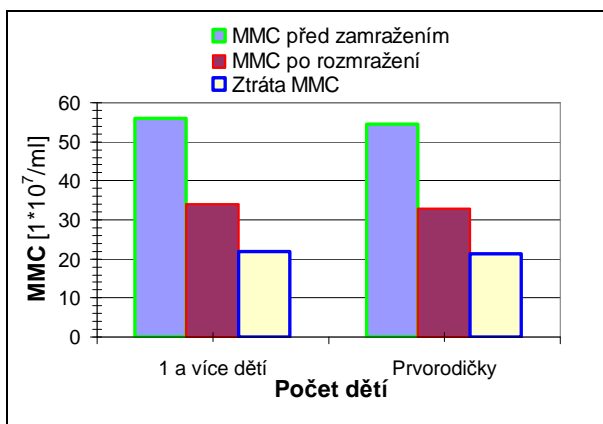
Změna krevního obrazu před a po rozmražení

Pokud budeme srovnávat prvorodičky s matkami, které již mají 1 či více dětí, zjistíme, že jsou počty leukocytů, erytrocytů a MNC v odebrané PK mezi těmito skupinami velmi podobné (grafy 29, 30, 31).

Průměrné ztráty u leukocytů byly 67%, u erytrocytů 52% a MNC 39%.



Graf 29, 30: Vlevo – Porovnání průměrných hodnot leukocytů mezi prvorodičkami a matkami s dětmi; Vpravo – Porovnání průměrných hodnot erytrocytů mezi prvorodičkami a matkami s dětmi

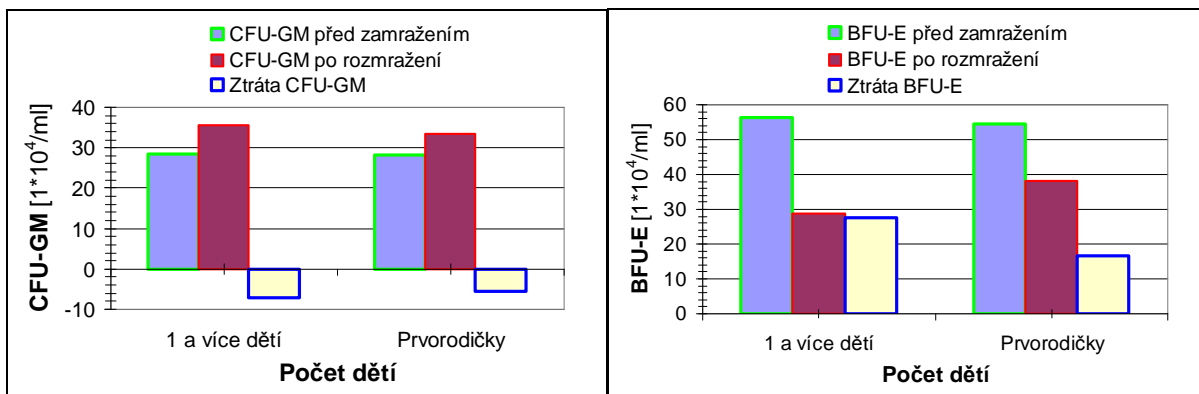


Graf 31: Porovnání průměrných hodnot MNC mezi prvorodičkami a matkami s dětmi

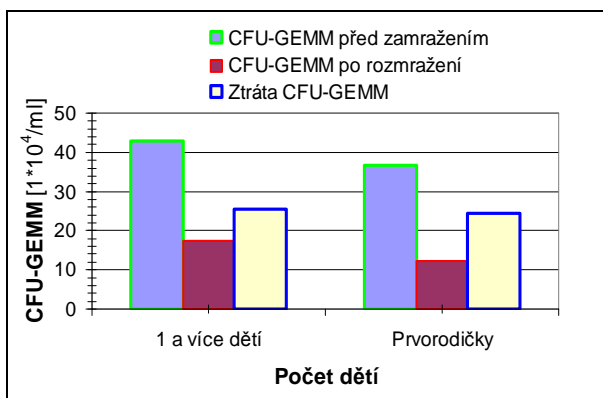
Změna počtu kolonií před a po rozmražení

Množství CFU-GM v PK po odběru je srovnatelné mezi oběma skupinami rodiček a opět je zde viditelný nárůst počtu kolonií CFU-GM po rozmražení vzorků – o 22% v průměru (graf 32).

V případech BFU-E a CFU-GEMM (grafy 33, 34) progenitorů jsou výsledky velmi podobné v obou skupinách před i po rozmražení. V průměru bylo u BFU-E zničeno kryokonzervací 40% buněk a u CFU-GEMM 63%.



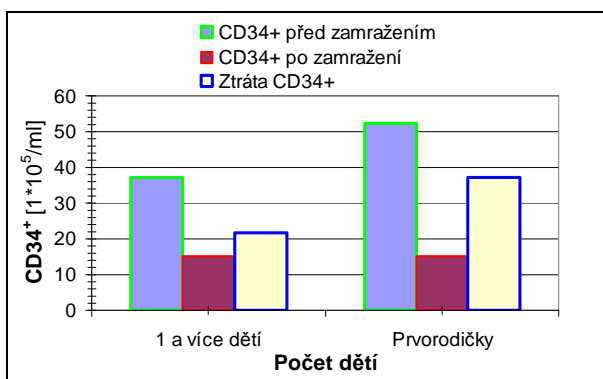
Graf 32, 33: Vlevo – Porovnání průměrných hodnot CFU-GM mezi prvorodičkami a matkami s dětmi; Vpravo – Porovnání průměrných hodnot BFU-E mezi prvorodičkami a matkami s dětmi



Graf 34: Porovnání průměrných hodnot CFU-GEMM mezi prvorodičkami a matkami s dětmi

Změna počtu CD34⁺ buněk před a po rozmražení

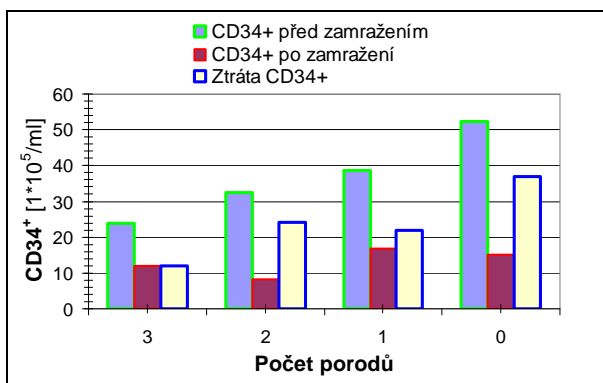
V odebrané PK je počet CD34⁺ buněk přibližně o 1/3 větší ve skupině prvorodiček než u matek s dětmi. Během kryokonzervace dochází v této skupině k vysokým ztrátám (71%), takže ve výsledku je množství CD34⁺ buněk v obou skupinách stejné (graf 35). Celkové ztráty jsou v tomto případě 66%.



Graf 35: Porovnání průměrných hodnot CD34⁺ mezi prvorodičkami a matkami s dětmi

Pokud budeme srovnávat konkrétní počty dětí / porodů a množství CD34⁺ buněk, dojdeme k velmi podstatnému zjištění.

Z následujícího grafu č. 36 je patrné, že existuje souvislost mezi dávkou CD34⁺ buněk v PK a počtem porodů. Největší množství CD34⁺ buněk se nachází v PK u prvorodiček, avšak se stoupajícím počtem porodů úměrně klesá i počet těchto buněk v odebrané PK. Ovšem pro potvrzení této teorie by bylo nutné provést další experimenty.



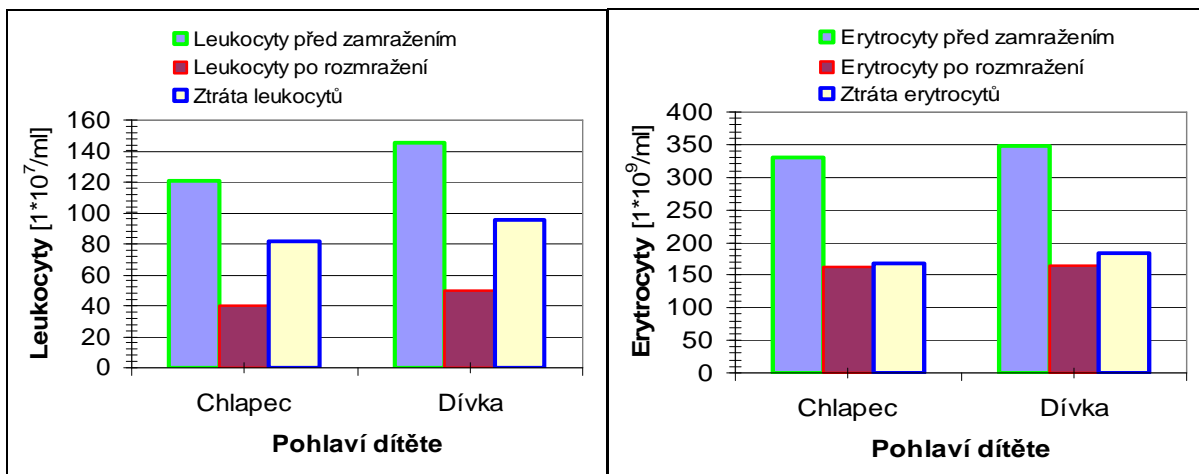
Graf 36: Průměrné hodnoty CD34⁺ buněk v závislosti na počtu porodů u matky

7.3.6 Analýza podle pohlaví dítěte

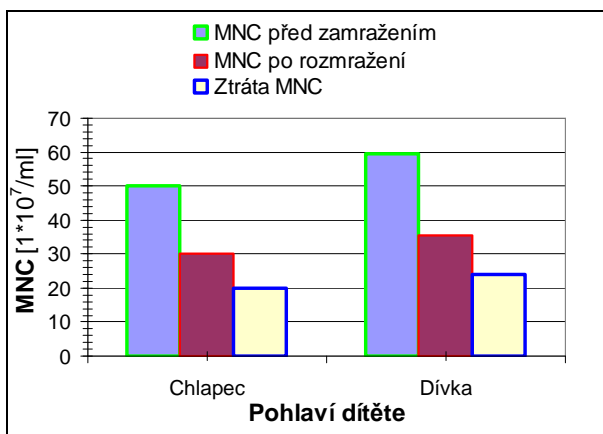
Změna krevního obrazu před a po rozmražení

Pohlaví dítěte na základě získaných dat neovlivňuje množství leukocytů, erytrocytů, ani MNC a to před i po kryokonzervaci (grafy 37, 38, 39). Hodnoty jsou však vždy nepatrně vyšší ve skupině dívek.

U leukocytů dochází k 67%, u erytrocytů 52% a u MNC 40% ztrátě.



Graf 37, 38: Vlevo – Porovnání průměrných hodnot leukocytů v závislosti na pohlaví dítěte; Vpravo – Porovnání průměrných hodnot erytrocytů v závislosti na pohlaví dítěte

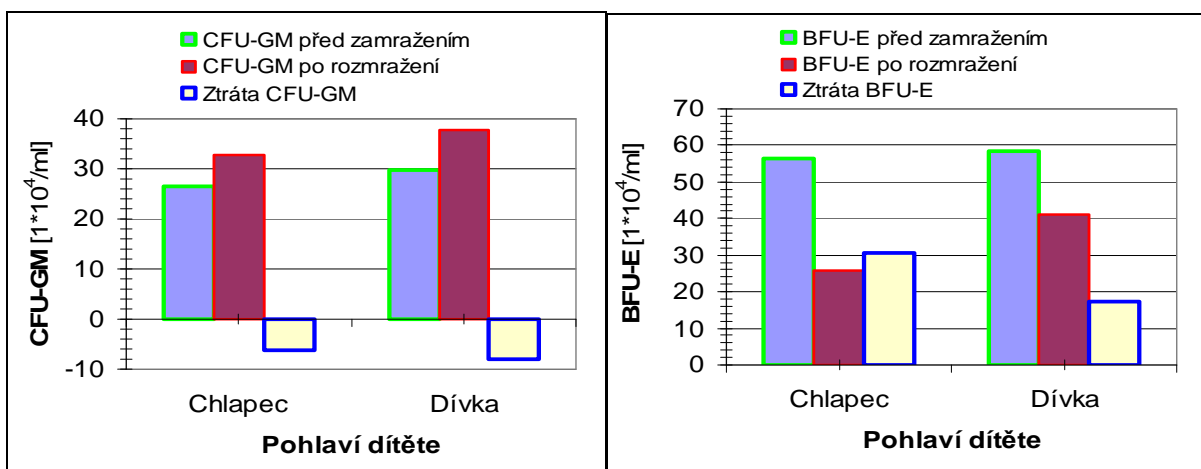


Graf 39: Porovnání průměrných hodnot MNC v závislosti na pohlaví dítěte

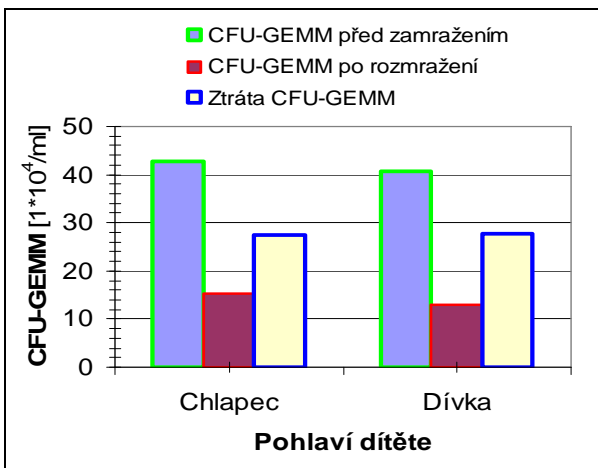
Změna počtu kolonií před a po rozmražení

Výsledky před i po rozmražení vzorků jsou u kolonií CFU-GM, BFU-E a CFU-GEMM mezi oběma skupinami (chlapci, dívky) velmi podobné (grafy 40, 41, 42), až na vyšší hodnoty BFU-E (o 23%) ve skupině dívek po kryokonzervaci.

U progenitorových buněk CFU-GM narůstá po kryokonzervaci počet kolonií v průměru o 25% (graf 40). Naopak ztráty u BFU-E jsou 42% a u CFU-GEMM 66%.



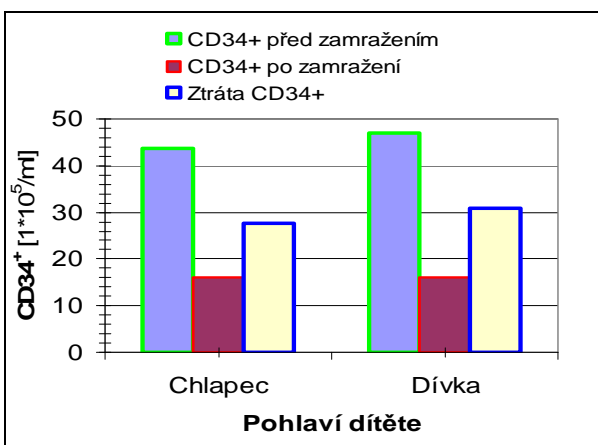
Graf 40, 41: Vlevo – Porovnání průměrných hodnot CFU-GM v závislosti na pohlaví dítěte; Vpravo – Porovnání průměrných hodnot BFU-E v závislosti na pohlaví dítěte



Graf 42: Porovnání průměrných hodnot CFU-GEMM v závislosti na pohlaví dítěte

Změna počtu CD34⁺ buněk před a po rozmražení

Před kryokonzervací jsou nepatrně vyšší hodnoty CD34⁺ buněk v PK u dívek, ale po rozmražení jsou výsledky mezi oběma skupinami naprosto shodné. V tomto případě byly průměrné ztráty 64%.



Graf 43: Porovnání průměrných hodnot CD34⁺ buněk v závislosti na pohlaví dítěte

7.3.7 Analýza podle krevní skupiny dítěte

Změna krevního obrazu před a po rozmražení

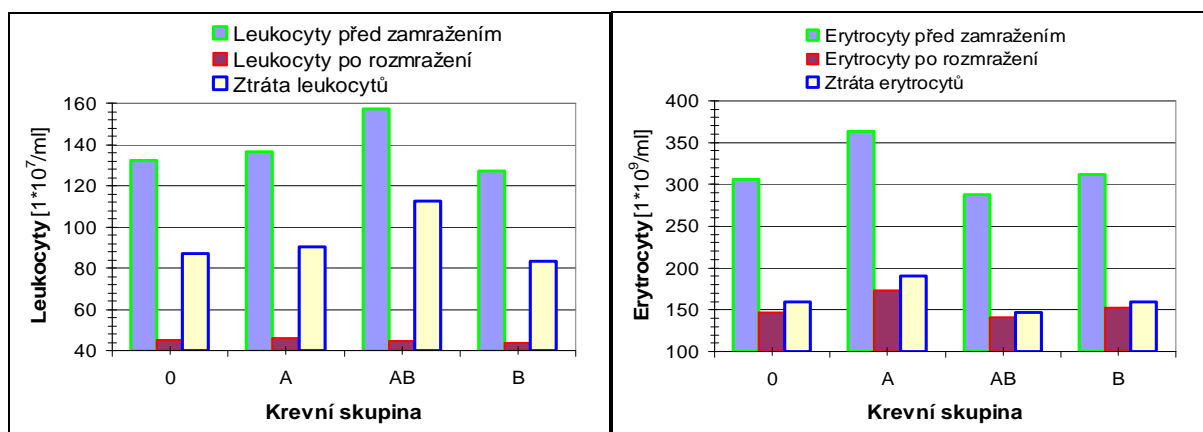
Největší počet leukocytů před zamražením je u KS AB (graf 44). Vzhledem k tomu, že tato KS byla zastoupena v celém souboru vzorků pouze třikrát, nelze považovat tento výsledek za jednoznačný. Pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba vyhodnotit větší množství PK s KS dítěte AB. Po rozmražení dochází přibližně ke stejným ztrátám (67% v průměru) u všech

krvních skupin, k nejvyšším u KS AB (72%). Ve výsledku je tak průměrné množství leukocytů po kryokonzervaci mezi jednotlivými krevními skupinami téměř stejné.

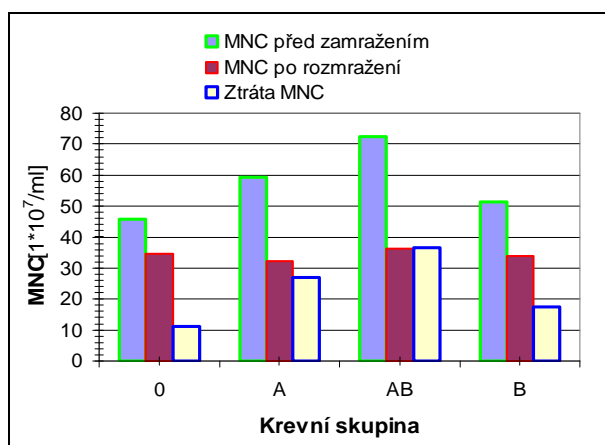
U MNC jsou před kryokonzervací nejvyšší hodnoty a následně i nejvyšší ztráty u KS AB. Po rozmrazení tak nejsou patrné žádné větší rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

Co se týče erytrocytů (graf 45), jejich největší množství je u KS A. Během kryokonzervace zde dochází také k největším ztrátám, i přesto však zůstávají hodnoty v této skupině nejvyšší. V dalších 3 krevních skupinách je množství erytrocytů i jejich následná ztráta kryokonzervací podobná.

Průměrné ztráty erytrocytů jsou 52%, MNC 40%.



Graf 44, 45: Vlevo – Průměrné hodnoty leukocytů v závislosti na krevní skupině dítěte; Vpravo – Průměrné hodnoty erytrocytů v závislosti na krevní skupině dítěte



Graf 46: Průměrné hodnoty MNC v závislosti na krevní skupině dítěte

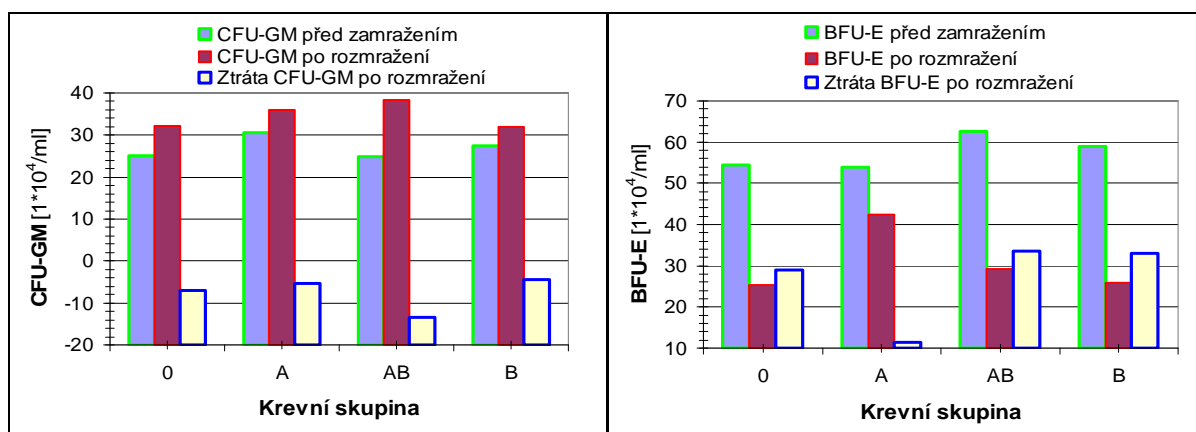
Změna počtu kolonií před a po rozmražení

V případě CFU-GM kolonií jsou výsledky téměř srovnatelné u všech 4 krevních skupin dítěte a to před i po rozmražení vzorků (graf 47). Po rozmražení navíc došlo k nárůstu počtu progenitorů CFU-GM průměrně o 28%.

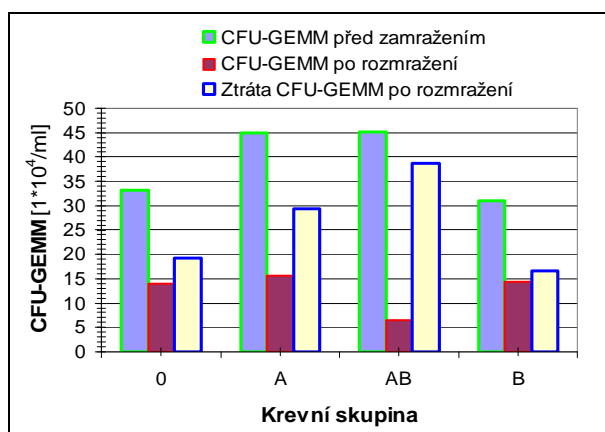
U BFU-E jsou počty kolonií u všech KS přibližně stejné (graf 48), kryokonzervací však dochází k nejmenším ztrátám u KS A – 21%, která se tak stává nejméně výtěžnější.

Nejvíce CFU-GEMM progenitorových buněk v odebrané PK najdeme u KS A a AB (graf 49), po rozmražení jsou v těchto skupinách také největší ztráty, obzvláště u KS AB je to až 85%, která se tak dostává na pozici nejméně výtěžné skupiny.

K největším ztrátám – 67% – docházelo v průměru u progenitorů CFU-GEMM, u BFU-E to bylo 47%.



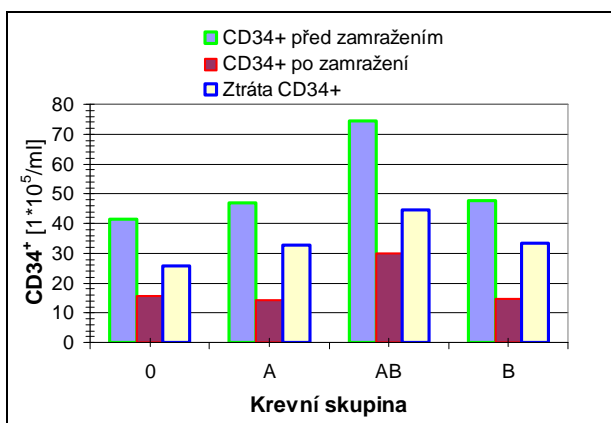
Graf 47, 48: Vlevo – Průměrné hodnoty CFU-GM v závislosti na krevní skupině dítěte; Vpravo – Průměrné hodnoty BFU-E v závislosti na krevní skupině dítěte



Graf 49: Průměrné hodnoty CFU-GEMM v závislosti na krevní skupině dítěte

Změna počtu CD34⁺ buněk před a po rozmražení

Pokud má dítě krevní skupinu AB je v PK výrazně vyšší množství CD34⁺ buněk v porovnání s ostatními skupinami (graf 50) a to před (o 39%) i po rozmražení, kdy je výtěžnost v této skupině dvakrát vyšší než u ostatních skupin. Opět však dochází k poměrně velkým ztrátám buněk po kryokonzervaci (65%) a to ve všech 4 skupinách.



Graf 50: Průměrné hodnoty CD34⁺ v závislosti na krevní skupině dítěte

Celkově lze říci, že nejvýtěžnější jsou krevní skupiny A a AB.

7.3.8 Analýza podle místa odběru PK

Tento paramater nemá přímý vliv na kvalitu PK, výjimkou je jen možnost mikrobiální kontaminace při odběru. Může však ovlivnit buněčnost PK nepřímo a to díky množství odebraného objemu. Čím vyšší objem PK se podaří odebrat, tím se také zvýší její buněčnost.

Pokud tedy budou dodrženy správné postupy při odběru, nedojde ke kontaminaci PK, získáme tak co největší objem PK a tím pádem i vyšší buněčnost.

8. Diskuze

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je metodou používanou k léčbě mnoha závažných maligních a nemaligních poruch. V současné době je hlavní zdroj hematopoetických kmenových buněk kostní dřeň alogenního příbuzenského nebo nepříbuzenského dárce, a nebo autologní hematopoetické kmenové buňky vyplavené do periferní krve. Oba výše zmíněné transplantáty mají prokazatelně dosažené úspěchy, avšak hledání vhodného dárce trvá 3–4 měsíce. Tato doba je často delší než doba, po kterou mohou čekat pacienti s vysoce rizikovým onemocněním [9]. Stejně tak není možné někdy použít tyto hlavní zdroje kmenových buněk pro HLA – inkompatibilitu a mnoho pacientů tak zemře při čekání na vhodného dárce [51]. Pupečnicková krev je tak zajímavým alternativním zdrojem hematopoetických kmenových buněk.

Ve srovnání s transplantací kostní dřeně představuje transplantace PK výhody jako jsou okamžitá dostupnost (průměrná doba k transplantaci 25–36 dní), žádná rizika pro dárce, vyšší frekvence vzácných haplotypů ve srovnání s registry dárců kostní dřeně, nižší výskyt a závažnost GvHD, možnost využití dárce vykazujícího rozdíly v antigenech HLA s příjemcem a velmi nízké riziko přenosu infekčních chorob, jako je virus Epstein-Barrové (EBV) a cytomegalovirus (CMV), u něhož byl prokázán vliv na zpoždění enfragmentu [52]. Přes tyto výhody velké zkušenosti získané v průběhu posledních desetiletí jasně ukázaly i zásadní omezení v použití PK a to zejména malý objem získané krve, nedostatečný počet kmenových a progenitorových buněk v pupečnickové krvi pro větší příjemce a tedy omezení tohoto zdroje kmenových buněk pouze na dětské pacienty. Stejně tak pacienti transplantovaní PK mohou být vystaveni zvýšenému riziku předčasných smrtelných komplikací kvůli nižší rychlosti přihojení dárcovské krvetvorby a opožděné obnově neutrofilů. V neposlední řadě nižší riziko GvHD by mohlo být chápáno jako vyšší riziko recidivy (tj. absence efektu štěp-versus-leukémie), stejně tak by mohlo docházet k vyššímu riziku přenosu genetické poruchy z důvodu nemožnosti sledovat růst a rozvoj kmenových buněk dárce. Ačkoli tato rizika nebyla potvrzena, nemohou být vyloučena.

Takže není překvapivé, že jsou testovány různé metody zamerané na zvýšení obsahu kmenových a jaderných buněk v pupečnickové krvi s cílem zlepšit uchycení štěpu a snížit TRM. Jde zejména o dvojité transplantace PK u stejného příjemce, infuze buněk PK přímo do

kosti a *ex-vivo* expanze se směsí cytokinů nebo mesenchymálních kmenových buněk (MSC), to vše by mohlo přispět ke zlepšení výsledků transplantace PK [6].

Z PK a placenty byly izolovány i další zajímavé nehematopoetické kmenové buňky, což vede představitel, že pupečnicková krev může být použita pro buněčnou terapii. Tyto buňky mohou být kultivovány a mohou diferencovat do různých tkání, včetně MSC, kostí, chrupavek, jater, slinivky břišní, neuronů, endoteliálních buněk, svalů, keratinocytů atd. Mají výhodu oproti jiným zdrojům embryonálních kmenových buněk, jejich nabídka je neomezená, mohou být použity v autologních nebo alogenních situacích, potřebují minimální manipulaci a nevyvolávají etické problémy. Budoucí studie budou testovat potenciál buněk pupečnickové krve pro léčení mnoha chorob včetně diabetu, artritidy, popálenin, neurologických poruch a infarktu myokardu. Ve fázi pokusů je již humánní terapie nahrazování různých tkání a orgánů, jako např. nahrazení srdečního svalu, nervové tkáně a chrupavky. Klinické studie probíhají u diabetu 1. typu, mozkové obrny a periferních cévních onemocnění. Zvláště slibné jsou první výsledky u diabetu 1. typu. Možnosti jsou nespočetné.

Nicméně příspěvek naivních regulačních T buněk v PK nelze ignorovat. Regulační T buňky z pupečnickových jednotek by mohly mít více supresivní aktivity, než buňky pocházející z dospělých zdrojů. Využití těchto buněk, stejně jako mezenchymálních kmenových buněk nacházejících se jak v pupečnickové krvi tak i v samotné pupeční šňůře, může přispět k nízkému výskytu GvHD jak je vidět po transplantaci PK a mají potenciál pro alternativní léčebné použití, jak je uváděno v pracích Tolara a dalších.

V současnosti jsou standardně hodnocenými faktory ovlivňujícími kvalitu transplantátu, úspěšnost a rychlost engraftmentu množství $CD34^+$ buněk a CFU-GM ve štěpu. Dále má na úspěšnost transplantace vliv dávka jaderných buněk a počet rozdílů v HLA (6/6, 5/6, 4/6) [8]. U řady pacientů se však v engraftmentu uplatňují různými mechanismy také hematopoetické kmenové buňky a progenitorové buňky. Rychlost engraftmentu může být navíc ovlivněna diagnózou, věkem příjemce, infekcemi, léky, GvHD a typem chemoterapie.

Buněčná dávka je však nejsilnějším a limitujícím faktorem ovlivňujícím výsledek transplantace. Koreluje s uchycením štěpu, frekvencí výskytu potransplantačních komplikací a celkově s přežitím pacienta [6, 8]. Bývá vyjádřena buď počtem všech jaderných buněk nebo počtem $CD34^+$ buněk ve štěpu na kilogram tělesné hmotnosti příjemce. Jako prahová byla stanovena dávka $1,7 \times 10^5 CD34^+/kg$, pod níž se pravděpodobnost příhojení a přežití výrazně

snižuje. Minimální počet jaderných buněk by měl být $3 \times 10^7/\text{kg}$ [1]. Počet buněk, které mají být obsaženy v infuzi, se dále zvyšuje s rostoucím počtem HLA rozdílů.

Nicméně na základě výsledku celé řady studií $\text{CD}34^+$ buňky představují nestejnorodou skupinu tvořenou především liniově zadanými progenitory a pouze velmi malým procentem pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Stále více prací poukazuje na různé subpopulace $\text{CD}34^+$ buněk jako prediktory rychlosti engraftmentu. Jiné subpopulace se uplatňují v krátkodobém a dlouhodobém engraftmentu. $\text{CD}34^+$ subpopulace nezbytné pro krátkodobý engraftment představují již převážně liniově zadané buňky, které umožní rychlou obnovu krvetvorby [51].

Pluripotentní kmenové buňky musí projít více buněčnými cykly než dají vzniknout zralým hematopoetickým buňkám a nepodílí se tak ve značné míře na rychlé obnově hematopoézy. Naopak jsou nezbytné pro trvalou obnovu krvetvorby a tedy dlouhodobý engraftment [51].

V této práci bylo zpracováno celkem 50 vzorků dárcovské pupečnickové krve novou metodou – uzavřeným systémem, díky které dochází k úplné eliminaci mikrobiální kontaminace vzorku. Zpracovány byly pouze PK, které splňovaly dvě základní kritéria – adekvátní objem a buněčnost. Z každé jednotky PK byl v průběhu zpracování odebrán navíc 1ml krve pro další analýzy, které se běžně neprovádí – kultivace PK a měření $\text{CD}34^+$ buněk před kryokonzervací.

Nejprve bylo nutné stanovit nejvhodnější kultivační metodu PK před kryokonzervací, aby následně mohlo dojít k optimálnímu srovnání ztrát, popř. nárůstu buněk či kolonií, a shodnocení, zda tyto ztráty/nárůst ovlivňují demografické faktory matky a dítěte.

Testovány byly tři kultivační metody na 10 vzorcích DPK, u nichž se sledovaly a hodnotily 3 základní parametry (viz 6.3). Jako nejlepší byla zvolena na základě získaných výsledků I. kultivační metoda, která byla dále používána u zbylých 40 vzorků DPK pro kultivaci před kryokonzervací. Obdoba této metody je v laboratoři používána pro kultivaci BM a PBSC před zamražením.

Hodnoty naměřené u vzorků po rozmražení byly přepočítány na objem PK před zamražením (odebraný objem PK), aby mohlo dojít k co nejpřesnějšímu srovnání. Ve skutečnosti je však objem PK po kryokonzervaci dvojnásobný díky kryoprotektivnímu roztoku, tudíž i dávky jednotlivých buněk jsou o polovinu vyšší.

Srovnávány byly následující demografické údaje o matce a dítěti:

Věk matky

Ze získaných výsledků bylo velmi překvapivé zjištění, že s přibývajícím věkem rodičky dochází k úměrnému navýšení počtu všech buněk i kolonií v odebrané PK. Z hlediska CD34⁺ buněk je celkově nejvýtežnější věk u matky v rozmezí 26 – 35 let, po překročení věkové hranice 35 let byl zaznamenán postupný pokles v počtu CD34⁺ buněk v PK.

Kryokonzervací ale dochází k výrazným ztrátám CD34⁺ buněk (průměrně 68%), obzvláště mezi 26. – 30. rokem matky. Dále byly zaznamenány vysoké ztráty u leukocytů (67%). Ve výsledku jsou tak počty leukocytů, MNC a erytrocytů mezi jednotlivými věkovými skupinami matek v zamražených štěpech PK podobné. V případě CFU-GM kolonií se zdá být kryokonzervace velmi šetrná a dokonce „prospěšná“, neboť po rozmražení docházelo k jejich výraznějšímu nárůstu. Naopak u progenitorů CFU-GEMM byly po kryokonzervaci zaznamenány vyšší ztráty – až 2/3.

Rozdíl času mezi odběrem a zpracováním PK

Je známo, že na buněčnost PK má výrazný vliv i časová ztráta mezi odběrem a zpracováním PK.

Dnes je obecně dodržovaným časovým standardem pro zpracování PK max. 48 hodin od jejího odběru. Ze získaných dat je evidentní, že tato doba nemusí být považována za hraniční, neboť u leukocytů, MNC, CD34⁺ buněk a progenitorů BFU-E došlo po 48. hodině k zvýšení jejich počtu, a stejně tak u progenitorů CFU-GM byly zachovány vyšší dávky buněk i po 48. hodině. Naopak, ke značným ztrátám došlo po překročení časového limitu u myeloidních progenitorů CFU-GEMM a u erytrocytů.

Jak již bylo uvedeno výše, abychom mohli dojít k jednoznačnému závěru, zda je nebo není 48. hodina limitní pro zpracování z hlediska výtěžnosti PK, bylo by potřeba provést na tuto analýzu rozsáhlejší studii.

Na základě výsledků ale můžeme s jistotou konstatovat, že největší buněčnost (množství leukocytů, erytrocytů, MNC, CD34⁺ buněk, CFU-GM a CFU-GEMM) je zachována v jednotkách PK, je-li krev zpracována mezi 13. a 24. hodinou od jejího odběru. Poté dochází k postupným ztrátám ve všech buněčných liniích. Výjimkou jsou kolonie BFU-E, u nichž jsou nejvyšší hodnoty dosaženy mezi 25. – 36. hodinou od odběru PK.

Opět i tady kryokonzervací dochází k velmi vysokým ztrátám (s výjimkou nárůstu kolonií po rozmražení u CFU-GM), ale počty buněk i nadále potvrzují jako nejlepší čas pro zpracování PK interval 13 – 24 hodin od odběru.

Krevní skupina matky

Krevní skupina matky má pouze částečný vliv na buněčnost PK. Za nejméně výtěžnou krevní skupinu lze označit „0“, která dosahovala téměř ve všech buněčných řadách před i po rozmražení nejnižších hodnot.

Ztráty po rozmražení byly i v této analýze vysoké, obzvláště u progenitorů CFU-GEMM u KS AB (až 77%). Výjimku opět představují kolonie CFU-GM se svým nárůstem po kryokonzervaci.

Celkově lze jako nejlepší KS, co do počtu jednotlivých buněk, označit skupinu AB, až na výraznou ztrátu u již zmíněných CFU-GEMM po rozmražení.

Krevní skupina dítěte

Prozatím nelze jednoznačně určit, zda má nebo nemá KS dítěte vliv na kvalitu PK. Z hlediska počtu leukocytů, MNC, CFU-GM progenitorů či CD34⁺ buněk se jako nejvýtěžnější KS jeví AB. V této studii však byly zpracovány pouze 3 PK, kdy dítě mělo KS AB, takže výsledek nelze považovat za průkazný. Navíc po zamražení dochází u této krevní skupiny k poměrně výrazným ztrátám všech buněk, až na kolonie CFU-GM, u kterých opět došlo po rozmražení k nárůstu a to u všech KS.

Naopak erytrocyty, BFU-E a CFU-GEMM kolonie byly nejvíce zastoupeny u KS A.

Kryokonzervací je však zničeno velké procento buněk u všech KS a ve výsledku je tak množství leukocytů, erytrocytů, MNC a progenitorů CFU-GM mezi jednotlivými krevními skupinami velmi podobné. Po rozmražení najdeme nejméně progenitorových buněk CFU-GEMM u krevní skupiny AB, neboť ztráty v tomto případě byly až 85%. Oproti tomu k nejmenším ztrátám u progenitorů BFU-E došlo u KS A (pouze ¼).

Nejvíce CD34⁺ buněk po kryokonzervaci najdeme opět u KS AB.

Zdá se tedy, že krevní skupina dítěte nemá vliv na buněčnost štepu PK. Abychom však mohli definitivně vyloučit její vliv na výtěžnost, bylo by nutné provést další experiment s větším počtem krevních skupin A a AB u dětí.

Prvorodičky a matky s 1 a více dětmi

Téměř zanedbatelné jsou rozdíly v dávkách jaderných buněk, erytrocytů, MNC a hematopoetických progenitorů mezi skupinami prvorodiček a matkami s alespoň 1 dítětem před i po rozmražení.

Zatímco CD34⁺ buňky jsou v PK po odběru výrazně vyšší u prvorodiček a to až o 27%, kryokonzervací dochází k tak drastickým ztrátám, že ve výsledku jsou dávky CD34⁺ buněk v zamražených štěpech mezi oběma skupinami rodiček naprosto shodné.

Z výše uvedeného by se dalo vyvodit, že počet prodělaných porodů neovlivňuje buněčnost štěpu. Na základě získaných hodnot však bylo zjištěno, že se zvyšujícím se počtem porodů, klesá v odebrané PK množství CD34⁺ buněk. Pro prokázání jasné souvislosti mezi počtem porodů a obsahem CD34⁺ buněk v PK je však nutné provést další experimenty s větším počtem vzorků.

Místo odběru a pohlaví dítěte

Tyto dva parametry nemají vliv na počty buněk v pupečnickové krvi.

Vliv kryokonzervace na buněčnost PK

Ze získaných dat je evidentní, že kryokonzervace má většinou velmi negativní dopad na počty buněk v PK, které často drasticky snižuje.

Největší ztráty utrpí vždy leukocyty – 67–68%. Ztráty u erytrocytů činily 52–53% a u MNC 39–43%. Kryokonzervací se ničí také velké procento CD34⁺ buněk – 64–68%.

Z řad progenitorů jsou kryokonzervací nejvíce postiženy CFU-GEMM kolonie, kdy ztráta nikdy neklesla pod 60%. Naopak odolnější se jeví BFU-E kolonie, u nichž docházelo v průměru k 45% ztrátám.

Naproti tomu velmi překvapivé byly výsledky u progenitorů CFU-GM. Po kryokonzervaci a následném rozmražení totiž docházelo k navýšení počtu kolonií ve všech srovnávacích analýzách a to od 22 až do 32%. Což lze vysvětlit, buď (1) velmi šetrnou metodou kryokonzervace, ale vzhledem k citelným ztrátám v ostatních buněčných řadách můžeme tuto teorii vyloučit, nebo (2) velmi velkou odolností těchto buněk.

Mnohem pravděpodobnější se však jeví skutečnost, že nebyly použity k sobě adekvátní metody kultivace před a po rozmražení PK.

Jak kvalitní jsou PK zpracované v této studii?

Pokud se budeme řídit v současnosti doporučenou minimální dávkou 3×10^7 jaderných buněk/kg příjemce, zjistíme, že pupečnickové krve zpracované v této studii by v případě potřeby mohly být použity do následujících hmotností příjemce:

Vzorek	kg	Vzorek	kg	Vzorek	kg	Vzorek	kg	Vzorek	kg
40	67	4	38	25	32	2	25	46	20
14	61	1	36	13	31	16	25	8	20
20	48	12	36	48	31	5	24	33	20
21	46	26	35	35	30	30	23	3	20
51	44	24	35	10	30	6	23	28	19
34	43	42	34	50	29	29	22	31	19
11	42	38	34	17	27	23	22	37	17
45	41	44	33	19	26	7	22	36	16
49	39	41	33	18	25	27	21	43	15
47	38	15	33	39	25	32	21	9	14

Tabulka 1: Výpočet hmotnosti příjemce, do které by mohla být zamražená PK použita k transplantaci

Z výsledku je patrné, že pro dospělého 75kg pacienta by z těchto 50 zpracovaných DPK nebyla vhodná žádná pupečnicková krev. Což bohužel potvrzuje fakt, že v současnosti je transplantace PK stále vhodnou alternativou jen pro děti. Ovšem pouze za předpokladu, že pomineme možnost kvantifikace buněk v PK, např. dvojitou transplantací (viz 3.7.2.2), čímž bychom zvýšili počet buněk v transplantátu a dosáhli prahové hodnoty buněčné dávky pro transplantaci. Dárcovské pupečnickové krve by tak byly vhodné i pro transplantaci dospělého pacienta.

Během své práce jsem došla k následujícím závěrům:

- Z hodnocených demografických faktorů výrazně ovlivňuje buněčnost odebrané PK věk matky a doba, která uplyne mezi odběrem a zpracováním.

Abychom získali co nejvyšší množství buněk v PK, zvláště jaderných buněk, CFU-GM progenitorů a CD34⁺ buněk, jejichž dávky jsou rozhodující pro engraftment štěpu PK, měla by být pupečnicková krev zpracována mezi 13. a 24. hodinou po odběru. V kombinaci s šetrnější kryokonzervační metodou bychom tak mohli mnohonásobně zvýšit výtěžnost PK po rozmrazení.

Navíc 48. hodina by nemusela být považována za limitní pro zpracování PK.

- Částečný vliv lze připsat KS matky a počtu dřívějších porodů.

Nejméně výtěžná je KS 0, naopak KS AB by mohla být co do celkového počtu buněk nejlepší KS, pokud by u ní nedocházelo kryokonzervací k vysokým ztrátám. Počet porodů ovlivňuje pouze dávku CD34⁺ buněk v PK – čím více předchozích porodů, tím nižší je dávka CD34⁺ buněk.

- Pro jednoznačný závěr, zda KS dítěte ovlivňuje výtěžnost PK, by bylo potřeba provést rozsáhlejší experiment s krevními skupinami A a AB. Na základě výsledků experimentu v této studii lze konstatovat, že krevní skupina dítěte neovlivňuje počty jednotlivých buněk v PK.
- Jak se dalo předpokládat žádný vliv na buněčnost PK nemá místo narození matky, ani pohlaví dítěte.
- Největší vliv má však jednoznačně metoda, která je použita pro zamražení PK. Pokud pomineme pozitivní výsledky u kolonií CFU-GM, má kryokonzervace bohužel velmi devastující vliv na buněčnost PK. V budoucnu bychom se měli zaměřit nejen na hledání co nejvhodnějších metod pro kvantifikaci buněk v PK, ale také na nalezení mnohem šetrnější metody zamrazování pupečnickové krve, která by nám tak umožnila dostat z tohoto cenného zdroje hematopoetických kmenových buněk maximum. Díky tomu by se zvýšila nejen úspěšnost a rychlost enfragmentu štěpu PK, ale značně by se rozšířila oblast příjemců, u nichž by transplantace PK mohla být použita pro léčbu celé řady vážných chorob, jak zhoubného, tak nezhooubného typu.

9. Závěr

Volba zdroje hematopoetických kmenových buněk pro transplantaci závisí na individuálních potřebách pacienta, charakteru nemoci, včetně naléhavosti transplantace, a velikosti pacienta. Obecně platí, že 8/8 HLA kompatibilní kostní dřev zůstane 'zlatým standardem' jako donor hematopoetických kmenových buněk, ale použití PK, jako alternativního zdroje transplantace krvetvorných kmenových buněk, by mělo být považováno za přiměřenou možnost u těch, kteří nemají k dispozici takto vhodného dárce, a pro ty, u kterých hraje velkou roli rychlost transplantace. Nicméně je jasné, že po transplantaci PK, se TRM zvyšuje s každým stupněm HLA neshody, takže u větších rozdílů v HLA systému jsou potřebné vyšší buněčné dávky. Kromě toho PBSC nebo BM jsou prozatím realističtějšími zdroji hematopoetických kmenových buněk u dospělých vzhledem k omezení buněčné dávky u PK. Proto by se výzkum v budoucnu měl zaměřit nejen na kvantifikaci buněk v PK, ale také na hledání co nejšetrnější metody kryokonzervace, aby bylo možné uchovat v PK co nejvyšší počet buněk.

Cílem této práce bylo zpracovat dostatečné množství vzorků novou metodou v uzavřeném systému, včetně následné kultivace hematopoetických buněk.

Dále měření exprese znaků CD34 na živých leukocytech pomocí flow cytometrie a to nejen ve vzorcích po rozmražení, což je v současné době již zahrnuto v rutinním vyšetření dárcovské pupečnickové krve, ale nově také před kryokonzervací PK.

V neposlední řadě bylo u naměřených hodnot sledováno, do jaké míry jsou ovlivňovány jednotlivými demografickými údaji o matce a dítěti. Srovnávány byly všechny dostupné informace uvedené v průvodní dokumentaci o odběru DPK a na základě získaných dat bylo zjištěno, že buněčnost PK ovlivňuje věk matky, ale také doba, která uplyne mezi odběrem a zpracováním pupečnickové krve. Dalším podstatným parametrem ovlivňujícím výtěžnost PK je jednoznačně kryokonzervace.

Celkové výsledky nejen z této studie poskytují jasné odůvodnění pro další zakládání a rozvoj bank PK po celém světě. Banky by se měly zaměřit na sběr větších jednotek s větším počtem CD34⁺ buněk, ale také na sbírání PK jednotek z etnických a rasových menšin, aby se zvýšila frekvence vzácných haplotypů. Kromě toho tyto výsledky naznačují, že by měla být do rutinního vyšetření PK zahrnuta také kultivace hematopoetických buněk PK před kryokonzervací. Tím by bylo možné zjistit celkovou kvalitu odebrané PK, ale také jednoznačně určit všechny faktory, které ovlivňují její buněčnost.

Před přijetím konečných závěrů je tak potřeba provést více srovnávacích studií, ale již dnes můžeme konstatovat, že jakákoliv odebraná a zpracovaná pupečnicková krev je velmi cenná, ať už pro její možné budoucí použití u nemocného nebo pro vědecké účely a výzkum, který by nás posunul zase o krok dál v této dosud nezcela probádané oblasti.

10. Použitá literatura

1. Navarrete, C., Contreras, M. (2009). Cord blood banking: a historical perspective. *British Journal of Hematology*, 147, 236–245.
2. Mitchel, S., Wagner, C., Wagner, J.E. (1997). Placenta and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood* December, 90, no. 12, 4665–4678.
3. Querol, S., Rubinstein, P., Marsh, S.G.E., Goldman, J., Madrigal, J. A. (2009). Cord blood banking: 'providing cord blood banking for a nation'. *British Journal of Hematology*, 147, 227–235.
4. Ballová, S. (2007). Odběr pupečnickové krve, Bc. práce, Fakulta humanitních studií, Univerzita Tomáše Bati, Zlín, Česká republika, 75 str.
5. Ballen, K. K. (2005). Next trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* May 15, vol. 105, no. 10, 3786–3792.
6. Locatelli, F. (2009) Improving cord blood transplantation in children. *British Journal of Hematology*, 147, 217–226.
7. Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldmann, A., Persey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., Orchard, P.J., Peters, Ch., Weisdorf, D.J., Ramsay, N.K.C., Davies, S. M. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 100, no. 5, 1611–1618.
8. Cooper, N., Cotter, F. E. (2009). Multipotential cord blood cells. Are they the future? *British Journal of Hematology*, 147, 159–160.
9. Smith, A.R., Wagner, J.E. (2009). Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *British Journal of Hematology*, 147, 246–261.
10. Hartus, D. T. (2009). Non-haematological use of cord blood stem cells. *British Journal of Hematology*, 147, 177–184.

11. Gluckman, E. (2009). Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *British Journal of Hematology*, 147, 192–199.
12. Rocha, V., Gluckman, E. (2009). Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *British Journal of Hematology*, 147, 262–274.
13. Pecka, M., a kol. (2010). *Praktická hematologie*. Informativ Art, s.r.o., Český Těšín, 1. vyd., str. 297 – 335, ISBN 978-80-903871-9-5.
14. Broxmeyer, H. E., Souhlas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., Boyse, E. A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem / progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Medical Sciences*, 86, 3828–3832.
15. Potěšilová, M. (2008). Genomické profilování CD34⁺ buněk pacientů s CML, Mgr. práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 63 str.
16. Baker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Blazar, B.R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Verfaillie, C.M., Wagner, J.E. (2005). Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*, 105, 1343–1347.
17. Weissman, Z., Anderson, I., Gage, D.F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 387–403.
18. Wunder, E., (2001). Chances and Limit of Cord Blood Transplantation. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 33, 71–83.
19. Hanáčková, M. (2008). Hematopoetické kmenové buňky, Bc. práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 46 str.
20. Petrenko, M., Huser, M. Pupečnicková krev – současné možnosti a perspektivy využití. *Praktická gynekologie* [online]. 2004, vol. 5, April, [cit. 2004-04-01]. Dostupný na [www. <http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_04_04_03.pdf>](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_04_04_03.pdf).
21. Masopust, J. Kmenové buňky a vznik nádorového onemocnění. 2. Lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a patobiochemie, Univerzita Karlova v Praze [online]. 2008, vol. 8, August, [cit. 2008-08-01]. Dostupný na [www.<http://www.roche-](http://www.roche-)

diagnostics.cz/download/prolekare/onkologicka/tumorigeneze_kmenove_bb_I_web_June08.pdf>.

22. Sauter, C., Barker, J.N. (2008). Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. *Current Opinion in Hematology*, 15, 568–575.
23. Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A. R., Berkowitz, R.L., Cabbad, M., Dobrila, M.L., Taylor, P.E., Rosenfield, R.E., Stevens, C.E. (1998). Outcomes among 562 recipients of placenta-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 339, 1565–1577.
24. Laughlin, M.J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J.E., Zhang M-J., Champlin, R.E., Stevens, C., Barker, J.N., Gale, R.P., Lazaru, H.M., Marks, D.I., van Rood, J.J., Scaradavou, A., Horowitz, M.M. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*, 351, 2265–2275.
25. Rocha, V., Labopin, M., Sany, G., Arcese, W., Schwerdtfeger, R., Bosi, A., Jacobsen, N., Ruutu, T., de Lima, M., Finke, J., Frassoni, F., Gluckman, E. (2004). Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*, 351, 2276–2285.
26. Ball, L.M., Bernardo, M.E., Roelofs, H., Lankester, A., Cometa, A., Egeler, M.R., Locatelli, F., Fibbe, W.E. (2007). Co-transplantation of *ex vivo* expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 110, 2764–2767.
27. Cornetta, K., Laughlin, M., Carter, S., Wall, D., Weinthal, J., Delaney, C., Wagner, J., Sweetman, R., McCarthz, P., Chao, N. (2005). Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11, 149–160.
28. Glickman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Lacatelli, F., Acrese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M., Chastang, C. (1997). Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, 337, 373–381.

29. Majhail, N.S., Brunstein, C.G., Wagner, J.E. (2006). Double umbilical cord blood transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 18, 571 – 575.
30. Kmenové buňky.
<<http://bunecnaterapie.cz/kmenove-bunky>>, staženo 15. 4. 2011.
31. Onemocnění.
<<http://www.pupecnikova-krev.cz/cz/onemocneni>>, staženo 20.11.2011.
32. Chci darovat.
<<http://www.bpk.cz/2/45/chci-darovat.html>>, staženo 26.6. 2011.
33. Odber pupočnickovej krvi.
<<http://www.ceptru.sk/pupocnikovakrvinfo/odber-spracovanie-a-skladovanie>>, staženo 23.11.2011.
34. Odběr pupečnickové krve.
<<http://www.bpk.cz/2/17/odber-pupecnikove-krve.html>>, staženo 20.4.2011.
35. Zpracování pupečnickové krve.
<<http://www.bpk.cz/2/18/zpracovani-pupecnikove-krve.html>>, staženo 20.4.2011.
36. Možnosti budoucího využití kmenových buněk.
<<http://www.cryo-save.cz/pouziti-kmenovych-bunek/moznosti-budouciho-vyuziti-kmenovych-bunek/>>, staženo 25.10.2011.
37. Základní členění kmenových buněk.
<<http://bunecnaterapie.cz/zakladni-cleneni-kmenovych-bunek>>, staženo 15.10.2011.
38. Pupčnicková krev.
<http://www.cordbloodcenter.cz/clanek/show/2/uvod_dopupecnikove_krve>, staženo 15.10.2011.
39. What are stem cells?
<http://www.cordblood.com/cord_blood_banking_with_cbr/banking/stem_cells.asp>, staženo 14.6.2011.
40. Hematopoetická kmenová buňka.
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Hematopoetick%C3%A1_kmenov%C3%A1_bu%C5%88ka>, staženo 15.4.2011.
41. Kostní dřev a mononukleární buňky.
<<http://www.eastport.cz/kmenove-bunky-a-media-poietics.html>>, staženo 20.11.2011.
42. Historie banky.
<<http://www.bpk.cz/4/23/historie-banky.html>>, staženo 15.4.2011.
43. Historie transplantací PK.
<<http://www.bpk.cz/4/4/historie-transplantaci-pk.html>>, staženo 15.4.2011.

44. Mezinárodní spolupráce.
<<http://www.bpk.cz/4/7/mezinarodni-spoluprace.html>>, staženo 15.4.2011.
45. Princip metody.
<<http://www.labaid.cz/cz/vmenu/cytometrie.aspx>>, staženo 29.11.2011.
46. Krejsek, J., Kopecký, O. (2004): Klinická imunologie, Nucleus HK, 1. vydání, ISBN 80-86225-50-X.
47. Text.
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJDJU.htm>, staženo 12.11.2011.
48. Dárcovství pupečnickové krve.
<http://www.cordbloodcenter.cz/clanek/show/42/darcovstvi_pupecnikove_krve#ulozit>, staženo 14.11.2011.
49. Využití pupečnickové krve.
<http://www.cordbloodcenter.cz/clanek/show/8/vyuzitipupecnikove_krve>, staženo 14.11.2011.
50. Ceptra.
<<http://www.cepra.sk/vasacepra/vasaceprsub3>>, staženo 14.11.2011.
51. Nováková, V. (2007). Analýza fenotypu subpopulací CD34⁺ buněk v transplantátu hematopoetických kměnových buněk a jejich role v engraftmentu krvetvorby v podmínkách autologní a zoogenní transplantace, PhD. práce, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, 104 str.
52. Matsumura, T., Narimatsu, H., Kami, M., Yuji, K., Kusými, E., Hori, A., Murashige, N. Tanaka, Y., Masuoka, K., Wake, A., Miyakoshi, .S., Kanda, Y., Taniguchi, S., (2007) Cytomegalovirus infection following umbilical cord blood transplantation usány reduced intensity conditioning regiment for adult patiens, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 13, 577–583.

11. Příloha 1 - Kontraindikace

POCHÁZEJÍCÍ Z MATČINY STRANY

KARDIOLOGIE

- Záněty arterií
- Endokarditida
- Perikarditida tuberkulózní
- Perikarditida jiného původu-ne starší než 1 rok
- Opakované záněty žil

CHIRURGIE

- Chirurgie nádorů
- Portální hypertenze a následky
- Gastrektomie
- Pankreatektomie
- Malformace cév
- Hypofyzektomie
- Odstranění nadledvinek

DERMATOLOGIE-ALERGOLOGIE

- Behcet
- Dermatitida herpetiformní
- Dermatomyositida
- Dermatoso bulózní
- Epiteliom basocelulární-ne starší než 1 rok
- Epiteliom spinocelulární-ne starší 5 let
- Erytém polymorfní polékový
- Erytém nodózní
- Hematodermie:
 - Mycosis fungoides
 - Retikulosa kožní
 - Leukóza kožní
 - Sezaryho syndrom
- Hirtusismus major
- Ichtyosa /jiné než vulgaris/
- Kaposiho sa
- Melanom progredující
- Psoriáza generalizovaná
- Reclinhausenova ch.major
- Toxidernie-Erythrodermie
- Arteriální vřed-gangréna
- Urticaria pigmentosa

ENDOKRINOLOGIE

- Diabetes ID a NID
- Insuficience adenohipofýsy
- Adenom hypofýsární nevyлéčený
- Diabetes insipidus

- Adenom štítné žlázy špatně kompenzovaný
- Basedova ch.
- Hashimotova tyreoiditida
- Tyreoiditida subakutní nevyлéčená
- Hyperparatyreosa:kalcémie nekompenzovaná
- Insuficience nadledvin
- Kongenitální hyperplázie nadledvin
- Virilismus nadledvinového původu
- Cushing syndrom
- Hyperaldosteronismus
- Feochromocytom
- Hyperlipidémie esenciální

GASTRO-ENTEROLOGIE

A HEPATOLOGIE

- Gastrektomie
- Rakovina žaludku
- Vředová choroba gastroduodena – vyléčená 1 rok zpět
- Ischemická kolitida
- Cronova choroba
- Krvácení do GIT
- Hemoragická proktokolitida
- Jaterní cirhosa
- Hemochromatosa idiopatická homozygotní nebo II
- Hepatitida alkoholická
- Hepatitida virová B,C,D
- Hepatitida chronická
- Jaterní cysta
- Pankreatitida akutní alkoholická
- Pankreatitida akutní biliární, virová nebo poléková – ne starší než 2 roky
- Pankreatitida chronická
- Peritonitida tuberkulózní – ne starší než 5 let
- Nádorová onemocnění

GYNEKOLOGIE-PORODNICTVÍ

- Maligní onemocnění prsu
- Léčení gonadotropními hormony původu hypofýsárního?
- Tuberkulóza genitálu – ne starší než 5 let

HEMATOLOGIE

- Dědičný deficit:
 - Erytrocytů
- Minkowski-Chauffard
- Enzymatické deficity:
 - Destiček
 - Leukocytů
 - Koagulace
- Trombocytopenie a trombocytopenie dědičné
- Srpkovitá anemie
- Talasemie major
- Srpkovitá anemie homozygotní
- Leukémie
- Lymfom
- Polyglobulie
- Porfyrie akutní
- Neutropenie chronická
- Splenektomie
- Koagulopatie
- Purpura trombocytopenická idiopatická
- Kryoglobulinémie
- Transfúze – ne starší než 1 rok

INFEKČNÍ ONEMOCNĚNÍ

- Borelióza i vyléčená
- Babesióza
- Brucelóza ne starší 2 let
- Horečka Q serologicky pozitivní
- Hepatitida B,C,D
- Břišní tyfus
- Creutzfeldt-Jacob onem. A přenosné spongiformní encefalopatie
- Lepra /onemocnění Hansen/
- Zdravý nosič HBsAg
- Vzteklna
- Infekce HIV a retroviry
- Riketsiosa s pozitivní serologií
- Syphyllis vyléčená a treponematózy
- Tuberkulóza plic - ne starší 5 let

PARAZITÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

- Echinokoková cysta – ne starší 1 rok
- Echinokokosa alveolární – ne starší 1 rok
- Leishmanioza viscerální
- Mycosy exotické: histoplasma, Koccidioidomycosa
- Hlístice: ankylostomóza, trichinóza s pozitivní serologií nebo hypereosinofilií
- Malárie

- Pobyť v oblasti s endemickou malárií: od 4 měs. do 3 let

- Pneumocystosa
- Schistosomiáza – ne starší 1 rok
- Trypanosomóza africká: spavá nemoc
- Trypanosomiasa americká: Chagasova nemoc
- Toxoplasmóza – ne starší 1 rok
- Mor
- Filariosa vyléčená – ne starší 6 měs.

NEMOCI Z POVOLÁNÍ

- Intoxikace a alergie
- Fyzikální příčiny: ionizující zařízení
- Nystagmus

NEFROLOGIE-UROLOGIE

- Chronická renální insuficience
- Chronická tubulo-intersticiální nefritida
- Chronická pyelonefritida
- Tuberkulóza ledvin – ne starší 5 let

NEUROLOGIE

- Úraz lebky s následky nebo v kontinuálním léčení
- Epilepsie
- Syndrom Guillain-Baré
- Myastenia
- Myopatie dědičná nebo získaná
- Creutzfeldt.-Jacobova nemoc, encefalopatie spongiformní přenosná
- Friedrichova nemoc
- Parkinsonova nemoc
- Tropicke spastické paraparesa
- Polyradikuloneuritida
- Roztroušená skleroza
- Amyotrofická laterální skleroza
- Ostatní onemocnění neurodegenerativní
- Leukoencefalopatie multifokální progresivní
- Panencefalitida sklerozující subakutní

ORL-PNEUMOLOGIE

- Těžká chronická bronchitida
- Dilatace bronchů
- Hemoptysa
- Lobektomie
- Tuberkulózní pleuritida – ne starší 5 let
- Pneumoektomie
- Sarkoidosa
- Tuberkulóza plic – ne starší 5 let

- Bronchopulmonální tumor

REVMATOLOGIE

- Kolagenosy
- Diseminovaný lupus erytematodes
- Onemocnění Fiessinger-Leroy-Reiterova choroba
- Revmatoidní juvenilní polyartritida vyléčená – ne starší 1 rok
- Revmatoidní polyartritida progresivní
- Progresivní autoagresivní revmatoidní artritida
- Psoriatická polyartritida
- Ankylozující spondylartritida
- Goujerot-Sjorgen sy

SYSTÉMOVÁ ONEMOCNĚNÍ

- Behcetova choroba
- Amyloidóza
- Hortonova choroba – arteriitis temporalis

OSTATNÍ

- Toxikomanie

POCHÁZEJÍCÍ Z OTCOVY STRANY

HEMATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

- Talasemie major
- Srpkovitá anemie
- Leukemie
- Lymfom
- Dědičný deficit:
 - Erytrocytů
- Minkowski-Chauffard
- Enzymatický deficit
 - Destiček
 - Leukocytů
 - Koagulace
- Dědičné trombocytopenie a trombocytopenie

OSTATNÍ

- Toxikomanie
- Infekce HIV
- Rakovina

PATOLOGIE TĚHOTENSTVÍ

KARDIOLOGIE

- Perikarditida virová – ne starší 6 měsíců

DERMATOLOGIE

- Dermatofyty u kterých byla zastavena léčba před 1 měsícem
- Erysipel zastavena léčba před 1 měsícem
- Erytém polymorfní infekční – ne starší 2 měs.
- Lichen planus nebo atrofická sklerosa – ne starší 6 měs.
- Melanom in situ-ne starší 1 rok
- Tetováž – ne starší 6 měsíců
- Vitiligo

ENDOKRINOLOGIE

GASTRO-ENTEROLOGIE A

HEPATOLOGIE

- Akutní leze žludeční: zhojená během posledních 6 měs
- Divertikulitida-6 měs
- Gastro-enteritida febrilní -2 měs
- Hepatitida poléková- 3 měs
- Virová hepatitida E-3 měs

GYNEKOLOGIE-PORODNICTVÍ

- Mykosa genitální-1 týden
- Pozitivní SAG v pochvě
- ATB CLONA (např. při odtoku PV)

HEMATOLOGIE

- Agranulocytosa poléková-léčená během posledních 6 měs
- Splenektomie potraumatická-během posledních 6 měs
- Antikoagulační léčba ukončená do 1 měs.
- Positiva aloprotilátek?

INFEKČNÍ ONEMOCNĚNÍ

- Rubeola
- Varicella
- Pásový opar
- CMV
- Herpes
- Listeriosa
- Příušnice
- Hepatitidy virové

Doba od proběhlého onemocnění:

- Arboviroza 3 měs
- Cholera 3 měs
- Hemoragická africká horečka 3 měs
- Aktinomykosa 2 měs
- Lymská boreliosa 6 měs
- Botulismus 3 měs

- Enteroviroza 3 měs
- Slintavka a kulhavka 1 měs
- Horečka tyfoidní 3 měs
- Gonokokové infekce 6 měs
- Chřipka 2 týdny
- Infekce anaeroby 6 týdnů
- Infekce způsobené G neg bakteriemi 6 týdnů
- Legionářská nemoc 3 měs
- Leptospiroza 3 měs
- Antrax 6 týdnů
- Meningokokové infekce 6 týdnů
- EBV 6 měsíců
- Vozňřivka a melioidosa 2 měs
- Myxoviroza 6 týdnů
- Parvoviroza 6 měs
- Pasteurelóza 6 týdnů
- Pneumokokciósa 2 týdny
- Červenka 2 týdny
- Salmonelósa ne tyfoidní 2 měs
- Stafylokokosa cutaneo-mukósní 2 týdny
- Septikémie 3 měs
- Streptokokoza 2 týdny
- Yersinioza 6 měs

PARASITÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

- Toxoplasmosa serokonverse
- Ataka malárie
- Cesty do endemických oblastí 5 měs
- Amebóza stěvní
- Amebóza viscerální ne starší 6 měs
- Filariósa ne starší 6 měs
- Leismaniosa kožní nebo kožně-mukósní
- Mykosa viscerální ne starší 6 měs
- Ankylostomiáza – hlístice stěvní
- Měňavka
- Trematodózy jater a plic: motolice

NEFROLOGIE-UROLOGIE

- Albuminurie
- Glomerulonefritida akutní
- Močová infekce
- Renální insuficience akutní
- Záchvat renální koliky ne starší 2 týdnů
- Nefritida tubulointerstickální akutní
- Pyelonefritida akutní

NEUROLOGIE

- Deprese v léčení

ORL-PNEUMOLOGIE

- Pneumopatie difusní neinfekční

- Angina 2 týdny
- Otitida 2 týdny
- Sinusitida 2 týdny
- Plicní abscea 6 měs
- Pneumotorax 6 měs
- Pleuritida virová nebo bakteriální 2 týdny
- Pneumopatie akutní 2 týdny

REVMATOLOGIE

VAKCINACE

- Srovnej KI dárcovství krve-délka bloku podle druhu vakcíny:
Živé vakcíny- 4 týdny (TBC, zarděnky, spalničky, p.o.polio), mrtvé vakcíny-48 hod (tetanus, difterie, chřipka, meningokok, cholera, polio parenter.) hepatitis A,B -48 hod rabies-48 hod (pokud došlo k pokousání zvířetem-1 rok) séra zvířecího původu 3 měsíce, pasivní imunizace lidskými imunoglobuliny 3 měsíce anti HBV po expozici 1 rok

OSTATNÍ

- Etylismus
 - Anomálie zjištěné při sonografii
 - Mnohočetné těhotenství
 - Karyotyp anomální

NOVOROZENEC

- Prematurita
- Tíseň plodu chronická
- Tíseň plodu akutní
- Infekce materno-fetální
- Malformace, které mohou být sdružené s anomáliemi hematologickými

DÍTĚ A SOUROZENCI V DOBĚ ODBĚRU A PO NĚM

HEMATOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

Malignity

- LA lymfoblastická
- LA myeloblastická
- L myeloidní chronická
- Sd myelodysplazie
- Hemoglobinurie paroxysmální noční
- Histiocytóza

Insuficience dřene, cytopenie, dědičné ch.

- Aplazie dřene

POCHÁZEJÍCÍ Z MATČINY STRANY

KARDIOLOGIE

- Záněty arterií
- Endokarditida
- Perikarditida tuberkulosní
- Perikarditida jiného původu-ne starší než 1 rok
- Opakované záněty žil

CHIRURGIE

- Chirurgie nádorů
- Portální hypertenze a následky
- Gastrektomie
- Pankreatektomie
- Malformace cév
- Hypofyzektomie
- Odstranění nadledvinek

DERMATOLOGIE-ALERGOLOGIE

- Behcet
- Dermatitida herpetiformní
- Dermatomyositida
- Dermatoso bulosní
- Epiteliom basocelulární-ne starší než 1 rok
- Epiteliom spinocelulární-ne starší 5 let
- Erytém polymorfní polékový
- Erytém nodosní
- Hematodermie:
 - Mycosis fungoides
 - Retikulosa kožní
 - Leukósa kožní
 - Sezaryho syndrom
- Hirtusismus major
- Ichtyosa /jiné než vulgaris/
- Kaposiho sa
- Melanom progredující
- Psoriáza generalizovaná
- Reklinhausenova ch.major
- Toxidermie-Erythrodermie
- Arteriální vřed-gangréna
- Urticaria pigmentosa

ENDOKRINOLOGIE

- Diabetes ID a NID
- Insuficience adenohipofýsy
- Adenom hypofysární nevyлéčený
- Diabetes insipidus

- Adenom štítné žlázy špatně kompenzovaný
- Basedova ch.
- Hashimotova tyreoiditida
- Tyreoiditida subakutní nevyлéčená
- Hyperparatyreosa:kalcémie nekompenzovaná
- Insuficience nadledvin
- Kongenitální hyperplazie nadledvin
- Virilismus nadledvinového původu
- Cushing syndrom
- Hyperaldosteronismus
- Feochromocytom
- Hyperlipidémie esenciální

GASTRO-ENTEROLOGIE

A HEPATOLOGIE

- Gastrektomie
- Rakovina žaludku
- Vředová choroba gastroduodena – vyléčená 1 rok zpět
- Ischemická kolitida
- Cronova choroba
- Krvácení do GIT
- Hemoragická proktokolitida
- Jaterní cirhosa
- Hemochromatosa idiopatická homozygotní nebo II
- Hepatitida alkoholická
- Hepatitida virová B,C,D
- Hepatitida chronická
- Jaterní cysta
- Pankreatitida akutní alkoholická
- Pankreatitida akutní biliární, virová nebo poléková – ne starší než 2 roky
- Pankreatitida chronická
- Peritonitida tuberkulosní – ne starší než 5 let
- Nádorová onemocnění

GYNEKOLOGIE-PORODNICTVÍ

- Maligní onemocnění prsu
- Léčení gonadotropními hormony původu hypofysárního?
- Tuberkulosa genitálu – ne starší než 5 let

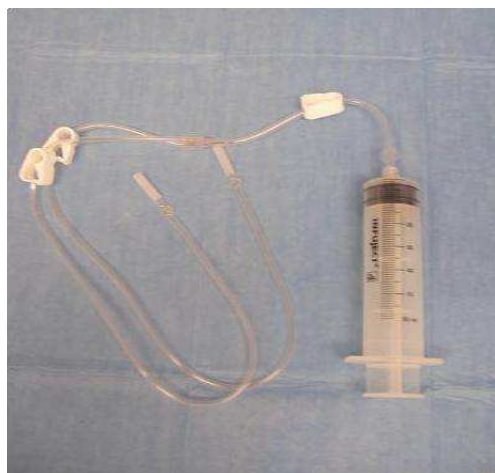
12. Příloha 2 – Fotky



Obrázek 9: Sterilní svářečka TCD B40 Haemonetics a svařovací nože



Obrázek 10: Jednocestný 10 ml Set I.



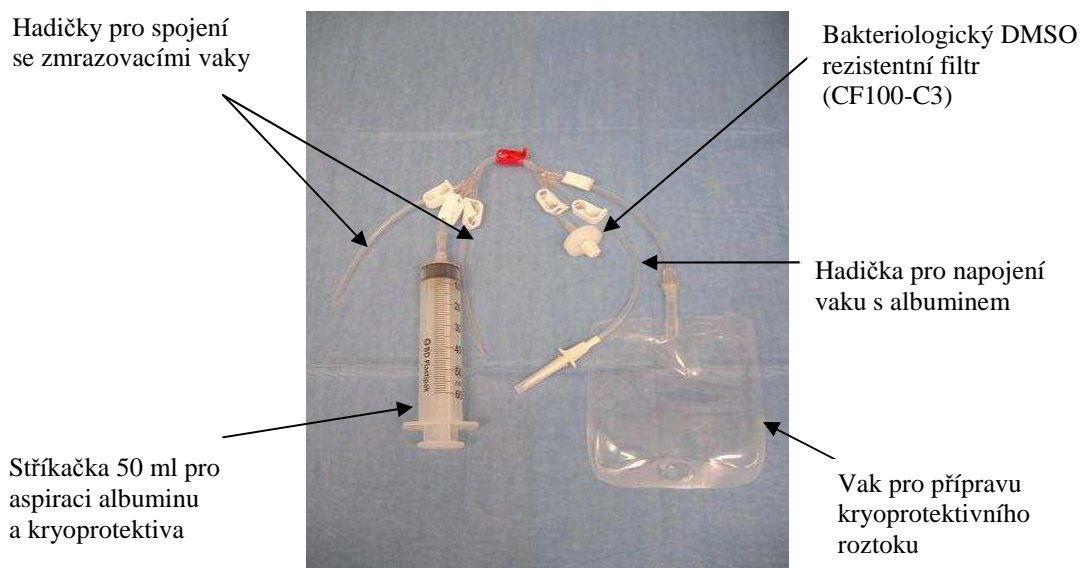
Obrázek 11: Dvoucestný 50 ml Set III.



Obrázek 12: Sterilní spojení zamrazovacího vaku A a Setu I.



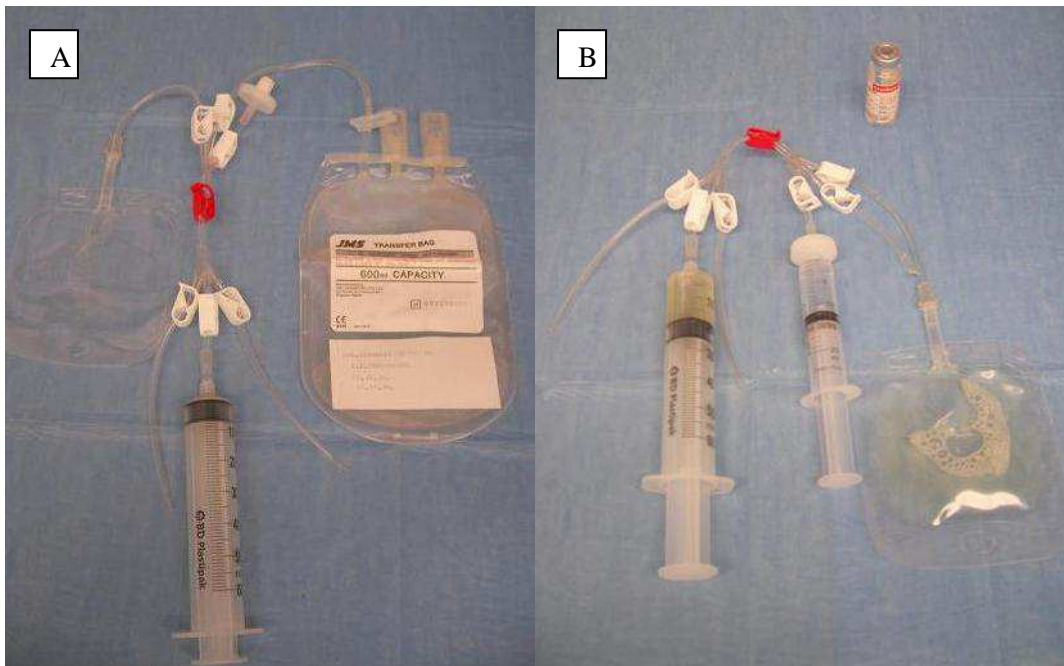
Obrázek 13: Sterilní spojení odběrového vaku DPK se zamrazovacím vakem A



Obrázek 14: Cryo prep set



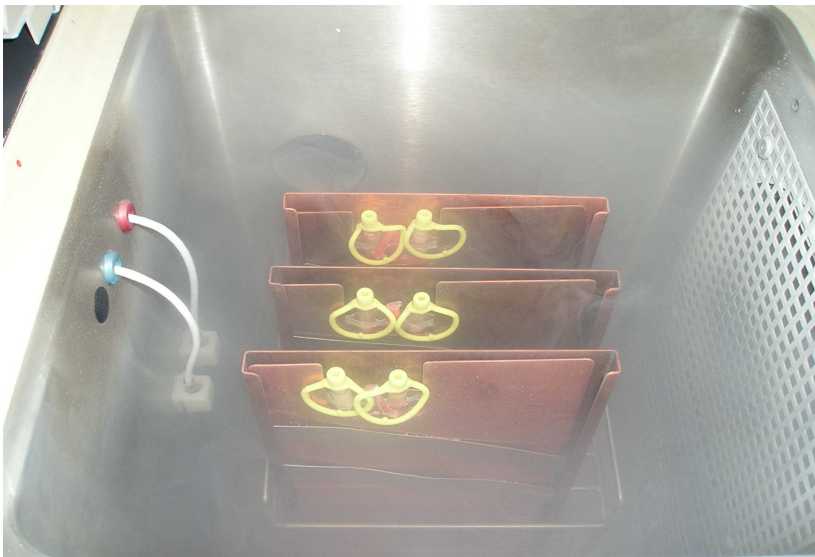
Obrázek 15: Zamražovací vaky A a B ve vychlazených gelových vacích



Obrázek 16: Příprava kryoprotektivního roztoku: (A) Spojení Cryo prep setu a transfer vaku s 5% lidským albuminem; (B) Přidávání DMSO k 5% lidskému albuminu do vaku Cryo prep setu



Obrázek 17: Přepouštění kryoprotektivního roztoku do zamrazovacích vaků



Obrázek 18: Komora zamrazovacího přístroje Ice Cube se třemi zamrazovacími vaky DPK v kovových deskách



Obrázek 19 : Zamrazovací vak B se zamraženou DPK



Obrázek 20: Kontejnery s LN² na kryobance

13. Příloha 3 – Výpočet vzorečku pro kultivaci před zamražením

Zdůvodnění výpočtu:

$$\text{Koncentrace} = \frac{\text{počet}}{\text{objem}}, \text{ tedy } c = \frac{n}{V}$$

V našem případě necht' je:

C_K ... původní koncentrace buněk ve vzorku

n ... počet buněk v daném objemu vzorku

V ... daný objem vzorku

C_1 ... je koncentrace buněk po 21× naředění vzorku, platí tedy, že $C_K = C_1 \times 21$

Ze suspenze 21× naředěné odebíráme objem V_1 - neboli počet buněk přítomných v objemu V_1 . Tento počet buněk se dále zvýšením objemu nemění a vždy jedna pětina tohoto počtu je kultivována na jedné kultivační misce. Jinými slovy, na 1 ml MethoCultu a tedy na jednu kultivační misku připadá jedna pětina objemu V_1 . Počet buněk na jedné misce tedy odpovídá počtu buněk v jedné pětině objemu V_1 .

Koncentrace kolonií v misce I je tedy $C_1 = \frac{N_I}{\frac{V_1}{5}} = \frac{N_I}{V_1} \cdot 5$, kde N_I je počet kolonií v misce římská I.

Protože odečítáme počet kolonií na dvou miskách, je vzorec následující:

$$C_1 = \frac{\frac{N_I + N_{II}}{\frac{2}{V_1}}}{5} = 5 \cdot \frac{N_I + N_{II}}{2 \cdot V_1} = 2,5 \cdot \frac{N_I + N_{II}}{V_1}$$

A protože je zkoumaný vzorek před kultivací 21× naředěn, konečná koncentrace kolonií v 1 ml zkoumaného vzorku je: $C_K = 2,5 \cdot \frac{N_I + N_{II}}{V_1} \cdot 21 = \frac{N_I + N_{II}}{V_1} \cdot 52,5$

P.S.

Objem V_1 je nutné zadat v ml, pokud jej zadáme v μl , výsledek musíme vynásobit tisícem.

14. Příloha 4 – Zdrojová data

Vzorek	Před zamražením												Po zamražení												Ztráta buněk po rozmražení		
	Objem (PK+CPDA) v ml	vitalita	miska 1			miska 2			Součet obou misek			+ DMSO: vzorky, v ml	vitalita	miska 1			miska 2			Součet obou misek			CFU-GM	BFU-E	MIX		
			B	Č	S	B	Č	S	CFU-GM	BFU-E	MIX			B	Č	S	B	Č	S	CFU-GM	BFU-E	MIX					
			CFU-GM			BFU-E			MIX					CFU-GM			BFU-E			MIX							
1	129	98	23	26	40	24	19	47	30,32	29,03	56,12	258	80	55	26	42	22	10	45	99,33	46,44	112,2	-19,4	5,805	0		
2	74	97	24	26	37	22	37	29	17,02	23,31	24,42	148	86	32	12	70	39	13	36	52,54	18,5	78,44	-9,25	14,06	-14,8		
3	68	97	21	48	32	27	21	23	16,32	23,46	18,70	136	86	28	5	63	30	4	39	39,44	6,12	69,36	-3,4	20,4	-16		
4	98	97	44	42	20	33	27	24	37,73	33,81	21,56	196	87	33	56	10	28	30	4	59,78	84,28	13,72	7,84	-8,33	14,7		
5	54	97	31	29	67	37	38	49	18,36	18,09	31,32	108	82	35	102	8	37	95	1	38,88	106,4	4,86	-1,08	-35,1	28,89		
6	83	96	53	69	23	46	61	25	41,09	53,95	19,92	166	85	40	90	12	28	57	4	56,44	122	13,28	12,87	-7,06	13,28		
7	62	97	29	12	8	11	24	23	12,40	11,16	9,61	124	80	10	11	15	14	10	10	14,88	13,02	15,5	4,96	4,65	1,86		
8	111	96	25	63	10	31	41	6	31,08	57,72	8,88	222	78	33	18	4	29	36	2	68,82	59,94	6,66	-3,33	27,75	5,55		
9	77	97	24	33	12	18	18	12	16,17	19,64	9,24	154	82	20	8	15	10	7	17	23,1	11,55	24,64	4,62	13,86	-3,08		
10	88	98	16	34	20	25	24	21	18,04	25,52	18,04	176	85	17	46	18	24	21	7	36,08	58,96	22	0	-3,96	7,04		
11	117	98	30	30	37	23	33	36	31,01	36,86	42,71	234	75	10	35	2	22	35	3	37,44	81,9	5,85	12,29	-4,1	39,78		
12	78	96	24	24	39	25	25	34	19,11	19,11	28,47	156	83	23	83	0	15	56	3	29,64	108,4	2,34	4,29	-35,1	27,3		
13	95	99	17	26	32	20	19	19	17,58	21,38	24,23	190	70	21	43	0	17	36	2	36,1	75,05	1,9	-0,48	-16,2	23,28		
14	145	97	32	39	42	34	36	48	47,85	54,38	65,25	290	80	66	200	0	39	200	0	152,3	580	0	-28,3	-236	65,25		
15	117	98	17	32	33	18	30	29	20,48	36,27	36,27	234	74	23	45	9	21	30	8	51,48	87,75	19,89	-5,27	-7,61	26,33		
16	87	99	23	37	52	27	40	45	21,75	33,50	42,20	174	75	44	3	100	25	7	73	60,03	8,7	150,5	-8,27	29,15	-33,1		
17	117	97	28	45	32	24	42	33	30,42	50,90	38,03	234	74	17	52	1	11	52	5	32,76	121,7	7,02	14,04	-9,95	34,52		
18	94	98	40	42	63	33	52	61	34,31	44,18	58,28	188	79	31	55	16	21	73	25	48,88	120,3	38,54	9,87	-16	39,01		
19	70	98	30	51	53	24	61	38	18,90	39,20	31,85	140	80	34	11	94	42	15	39	53,2	18,2	93,1	-7,7	30,1	-14,7		
20	128	98	38	64	75	30	52	46	43,52	74,24	77,44	256	87	68	3	99	48	4	109	148,5	8,96	266,2	-30,7	69,76	-55,7		
21	106	97	24	29	44	15	28	48	20,67	30,21	48,76	212	85	27	20	5	76	70	12	109,2	95,40	18,02	-33,9	-17,5	39,75		
23	114	98	16	29	29	12	35	34	15,96	36,48	35,91	228	88	14	10	8	24	16	4	43,32	29,64	13,68	-5,7	21,66	29,07		
24	108	97	10	44	36	20	32	20	16,20	41,04	30,24	216	90	3	7	0	38	29	2	44,28	38,88	2,16	-5,94	21,6	29,16		
25	103	99	25	33	42	24	30	44	25,24	32,45	44,29	206	92	25	22	5	102	74	20	130,8	98,88	25,75	-40,2	-17	31,42		
26	91	97	30	45	60	27	49	43	25,94	42,77	46,87	182	90	40	18	7	81	59	12	110,1	70,07	17,29	-29,1	7,735	38,22		
27	93	98	27	54	69	16	39	45	20,00	43,25	53,01	186	89	24	9	2	40	39	9	59,52	44,64	10,23	-9,77	20,93	47,9		
28	80	98	33	73	100	27	75	66	24,00	59,20	66,40	160	93	14	13	0	73	40	21	69,6	42,4	16,8	-10,8	38	58		
29	115	97	13	42	28	21	41	17	19,55	47,73	25,88	230	87	11	12	4	18	20	6	33,35	36,80	11,5	2,875	29,33	20,13		
30	69	98	21	45	46	18	46	31	13,46	31,40	26,57	138	86	4	8	0	26	18	4	20,7	17,94	2,76	3,105	22,43	25,19		
31	117	98	44	29	47	34	45	51	45,63	43,29	57,33	234	87	14	7	5	19	21	9	38,61	32,76	16,38	26,33	26,91	49,14		
32	81	96	32	87	54	29	70	65	24,71	63,59	48,20	162	89	21	19	9	83	43	12	84,24	50,22	17,01	-17,4	38,48	39,69		
33	66	97	43	68	66	28	79	54	23,43	48,51	39,60	132	90	19	17	5	84	49	21	67,98	43,56	17,16	-10,6	26,73	31,02		
34	182	98	35	55	60	37	38	58	65,52	84,63	107,38	364	91	36	33	10	56	44	21	167,4	140,1	56,42	-18,2	14,56	79,17		
35	84	98	27	71	68	35	73	63	26,04	60,48	55,02	168	92	21	23	3	79	72	14	84	79,80	14,28	-16	20,58	47,88		
36	72	97	42	54	69	39	55	60	29,16	39,24	46,44	144	90	22	19	4	80	53	31	73,44	51,84	25,20	-7,56	13,32	33,84		
37	64	98	36	105	60	32	64	99	21,76	54,08	50,88	128	89	31	15	5	76	57	10	68,48	46,08	9,6	-12,5	31,04	46,08		
38	110	97	27	33	57	26	37	53	29,15	38,50	60,50	220	89	19	13	1	37	35	8	61,6	52,8	9,9	-1,65	12,1	55,55		
39	70	97	30	104	61	22	80	74	18,20	64,40	47,25	140	91	9	10	0	56	53	15	45,5	44,10	10,50	-4,55	42,35	42		
40	116	98	43	97	86	43	75	86	49,88	99,76	99,76	232	86	27	18	5	70	44	12	112,5	71,92	19,72	-6,38	63,8	89,9		
41	111	97	51	101	51	37	186	68	48,84	159,29	66,05	222	84	21	16	4	88	67	22	121	92,13	28,86	-11,7	113,2	51,62		
42	91	96	23	128	27	28	124	24	23,21	114,66	23,21	182	89	18	16	5	54	29	21	65,52	40,95	23,66	-9,56	94,19	11,38		
43	85	98	8	55	39	14	77	24	9,35	56,10	26,78	170	85	8	13	0	26	22	11	28,9	29,75	9,35	-5,1	41,23	22,1		
44	87	98	38	125	32	43	81	25	35,24	89,61	24,80	174	93	21	19	2	45	35	0	57,42	46,98	1,74	6,525	66,12	23,93		
45	91	98	29	85	70	43	58	50	32,76	65,07	54,60	182	89	14	15	0	50	27	19	58,24	38,22	17,29	3,64	45,96	45,96		
46	110	96	53	140	49	38	137	35	50,05	152,35	46,20	220	90	24	21	5	50	47	4	81,4	74,80	9,9	9,35	115	41,25		
47	77,5	99	42	120	39	31	97	32	28,29	84,09	27,51	155	95	19	14	6	92	51	13	86,03	50,38	14,73	-14,7	58,9	20,15		
48	103,5	99	54	87	35	41	89	38	49,16	91,08	37,78	207	90	9	12	0	52	36	14	63,14	49,68	14,49	17,6	66,24	30,53		
49	104,5	98	26	75	4	34	81	8	31,35	81,51	6,27	209	80	12	14	0	56	30	10	71,06	45,98	10,45	-4,18	58,52	1,045		
50	80,5	99	42	149	0	40	125	0	33,01	110,29	0,00	161	85	31	17	5	108	29	21	111,9	37,03	20,93	-22,9	91,77	-10,5		
51	87,5	99	46	121	6	31	108	4	33,69	100,19	4,38	175	65	44	27	7	109	77	31	133,88	91	33,25	-33,3	54,69	-12,3		

Vzorek	Před zamražením								Po rozmražení								Výsledná ztráta buněk po rozmražení			
	Objem	CD34+	Krevní obraz					Objem	CD34+	Krevní obraz					Leukocyty	Erytrocyty	MNC	CD34		
			Počet leukocytů	Celkem leukocytů	Počet Erytrocytů	Celkem erytrocytů	Počet MNC			Celkem MMC	Počet leukocytů	Celkem leukocytů	Počet erytrocytů	Celkem erytrocytů					Počet MNC	Celkem MMC
1	129	68,11	12,00	154,80	3,68	474,72	5,19	66,95	258,00	36,10	4,24	109,39	1,72	443,76	3,79	97,78	100,11	252,84	18,06	32,01
2	74	26,55	13,80	102,12	3,12	230,88	6,63	49,06	148,00	12,00	5,07	75,04	1,59	235,32	4,29	63,49	64,60	113,22	17,32	14,55
3	68	24,65	14,50	98,60	3,31	225,08	5,13	34,88	136,00	8,87	4,35	59,16	1,37	186,32	3,47	47,19	69,02	131,92	11,29	15,78
4	98	29,03	15,60	152,80	2,91	285,18	6,84	67,03	196,00	19,16	5,75	112,70	1,33	260,68	4,43	86,83	96,45	154,84	23,62	9,87
5	54	40,16	20,10	108,54	3,58	193,32	8,54	46,12	108,00	16,67	6,71	72,47	1,72	185,76	4,88	52,70	72,31	100,44	19,77	23,49
6	83	67,20	14,20	117,90	4,03	334,49	5,25	43,58	166,00	24,00	4,13	68,56	1,75	290,50	3,23	53,62	83,62	189,24	16,77	43,20
7	62	6,06	16,30	101,00	2,89	179,18	6,81	42,22	124,00	3,28	5,29	65,60	1,12	138,88	3,87	47,98	68,20	109,74	18,23	2,78
8	111	15,11	9,72	107,90	2,97	329,67	4,61	51,17	222,00	5,50	2,75	61,05	1,20	266,40	2,14	47,51	77,38	196,47	27,42	9,61
9	77	17,56	11,40	87,80	3,66	281,82	5,30	40,81	154,00	6,50	2,64	40,66	1,56	240,24	2,02	31,11	67,47	161,70	25,26	11,06
10	88	11,26	12,80	112,60	3,41	300,08	3,67	32,30	176,00	7,20	5,11	89,94	1,69	297,44	4,71	82,90	67,63	151,36	-9,15	4,06
11	117	41,93	12,80	149,76	3,23	377,91	4,59	53,70	234,00	33,00	5,40	126,36	1,58	369,72	3,75	87,75	86,58	193,05	9,83	8,93
12	78	48,05	17,60	137,28	3,77	294,06	6,04	47,11	156,00	47,43	6,91	107,79	1,88	293,28	5,36	83,16	83,39	147,42	5,53	0,62
13	95	45,06	15,30	145,35	2,93	278,35	5,32	50,54	190,00	43,94	4,92	93,48	1,52	288,80	4,05	76,95	98,61	133,95	12,07	1,12
14	145	206,89	16,40	237,80	3,54	513,30	7,53	109,19	290,00	63,64	6,27	181,83	1,59	461,10	4,05	117,45	146,89	282,75	50,47	143,25
15	117	53,25	12,30	143,91	4,40	514,80	1,28	14,98	234,00	53,20	4,21	98,51	2,12	496,08	2,44	57,09	94,66	266,76	-13,57	0,05
16	87	67,77	19,00	165,30	3,54	307,98	6,62	57,59	174,00	26,00	4,26	74,12	1,74	302,76	2,83	49,24	128,24	156,60	32,97	41,77
17	117	17,80	8,45	98,87	3,24	379,08	2,85	33,35	234,00	9,06	3,52	82,34	1,62	379,08	1,66	38,84	57,70	189,54	13,93	8,74
18	94	39,31	10,20	95,88	3,56	334,64	4,24	39,86	188,00	9,16	4,06	76,33	1,66	312,08	2,30	43,24	57,72	178,60	18,24	30,15
19	70	26,64	17,30	121,10	3,46	242,20	6,17	43,19	140,00	16,38	5,57	77,98	1,72	240,80	4,07	56,98	82,11	121,80	14,70	10,26
20	128	74,42	17,10	218,88	4,34	555,52	8,42	107,78	256,00	35,65	5,57	142,59	2,25	576,00	3,82	97,79	147,59	267,52	58,89	38,77
21	106	20,51	21,50	227,90	3,57	378,42	9,12	96,67	212,00	51,22	6,53	138,44	1,87	396,44	4,00	84,80	158,68	180,20	54,27	-30,71
23	114	18,13	10,60	120,84	3,21	365,94	4,92	56,09	228,00	17,43	2,94	67,03	1,52	346,56	2,03	46,28	87,33	192,66	32,95	0,70
24	108	17,55	12,50	135,00	3,59	387,72	4,88	52,70	216,00	16,62	4,81	103,89	1,71	369,36	3,43	74,09	83,06	203,04	15,66	0,93
25	103	41,82	11,60	119,48	3,53	363,59	4,13	42,54	206,00	14,18	4,59	94,55	1,57	323,42	3,52	72,51	72,21	201,88	6,29	27,64
26	91	87,25	18,80	171,08	3,40	309,40	7,77	70,71	182,00	38,85	5,77	105,01	1,70	309,40	4,48	81,54	118,58	154,70	29,94	48,40
27	93	33,26	14,40	158,40	3,52	327,36	9,40	87,42	186,00	7,04	3,44	63,98	1,68	312,48	2,28	42,41	126,41	171,12	66,22	26,22
28	80	11,62	12,10	96,80	4,15	332,00	7,36	58,88	160,00	11,29	3,53	56,48	2,05	328,00	2,48	39,68	68,56	168,00	39,04	0,33
29	115	2,13	8,93	106,26	3,65	419,75	3,76	43,24	230,00	15,45	2,92	67,16	1,87	430,10	2,02	46,46	72,68	204,70	20,01	-13,32
30	69	1,71	12,40	85,56	2,83	195,27	5,24	36,15	138,00	10,33	4,99	68,86	1,37	189,06	3,40	46,92	51,13	100,74	12,69	-8,62
31	117	50,54	8,15	95,35	3,43	401,31	3,62	42,35	234,00	24,61	2,39	55,93	1,72	402,48	2,01	47,03	67,39	200,07	18,84	25,93
32	81	23,47	13,80	111,78	3,75	303,75	5,53	44,79	162,00	22,45	3,85	62,37	1,53	247,86	3,01	48,76	80,60	179,82	20,41	1,02
33	66	35,48	12,80	84,48	3,16	208,56	5,13	33,86	132,00	19,65	4,51	59,53	1,59	209,88	4,02	53,06	54,72	103,62	7,33	15,83
34	182	120,27	11,20	203,84	4,28	778,96	4,88	88,82	364,00	75,60	3,58	130,31	1,42	516,88	3,21	116,84	138,69	520,52	30,40	44,67
35	84	38,81	16,50	138,60	3,18	267,12	7,77	65,27	168,00	37,90	5,37	90,22	1,46	245,28	4,91	82,49	93,49	144,48	24,03	0,91
36	72	77,93	13,70	98,64	3,54	254,88	7,53	54,22	144,00	21,30	3,36	48,38	2,09	300,96	2,86	41,18	74,45	104,40	33,63	56,63
37	64	31,05	14,70	94,08	2,62	167,68	4,88	31,23	128,00	26,03	3,91	50,05	1,05	134,40	2,70	34,56	69,06	100,48	13,95	5,02
38	110	18,30	12,80	140,80	3,54	389,40	4,95	54,45	220,00	30,69	4,65	102,30	1,70	374,00	3,08	67,76	89,65	202,40	20,57	-12,39
39	70	24,08	17,20	120,40	3,23	226,10	9,55	66,85	140,00	22,40	5,38	75,32	1,56	218,40	3,51	49,14	82,74	116,90	42,28	1,68
40	116	43,73	13,00	150,80	3,40	394,40	3,99	46,28	232,00	76,56	8,62	199,98	1,80	417,60	6,96	161,47	50,81	185,60	-34,46	-32,83
41	111	105,00	15,00	166,50	4,48	497,28	5,10	56,61	222,00	75,48	4,48	99,46	2,10	466,20	3,62	80,36	116,77	264,18	16,43	29,52
42	91	39,51	16,70	151,97	3,56	323,96	8,24	74,98	182,00	22,62	5,65	102,83	1,80	327,60	3,14	57,15	100,56	160,16	46,41	16,89
43	85,00	19,51	9,98	84,83	2,88	244,80	4,32	36,72	170,00	40,80	2,65	45,05	1,50	255,00	1,94	32,98	62,31	117,30	20,23	-21,29
44	87,00	19,60	12,50	108,75	3,07	267,09	4,60	40,02	174,00	45,94	5,74	99,88	1,90	330,60	2,79	48,55	58,81	101,79	15,75	-26,34
45	91,00	41,17	17,40	158,34	3,52	320,32	8,37	76,17	182,00	15,88	6,71	122,12	1,87	340,34	4,31	78,44	97,28	150,15	36,95	25,29
46	110,00	23,98	9,48	104,28	3,38	371,80	5,87	64,57	220,00	23,94	2,79	61,38	1,81	398,20	2,08	45,76	73,59	172,70	41,69	0,04
47	77,50	151,70	22,50	174,37	3,46	268,15	8,38	64,94	155,00	134,84	7,31	113,31	1,85	286,75	5,94	92,07	117,72	124,78	18,91	16,86
48	103,50	30,53	11,80	122,13	3,42	353,97	4,40	45,54	207,00	14,74	4,45	92,12	1,66	343,62	3,36	69,55	76,07	182,16	10,77	15,79
49	104,50	75,49	17,20	179,74	3,47	362,61	8,11	84,75	209,00	8,19	5,60	117,04	1,73	361,57	5,17	108,05	121,22	181,83	30,73	67,30
50	80,50	48,98	16,90	136,05	4,08	328,44	6,85	55,14	161,00	17,36	5,39	86,78	1,98	318,78	4,51	72,61	92,66	169,05	515,13	31,62
51	87,50	114,66	27,30	238,88	3,22	281,75	6,24	54,60	175,00	104,44	7,46	130,55	1,62	283,50	5,89	103,08	173,61	140,00	3,06	10,22

Vzorek	Matka					Narozené dítě							
	Rok narození	Narození	Kraj	Krevní skupina	Předchozí těj.		Pohlaví	Odběr PK			Zpracování PK		KS dítěte
					Děti			Doba odb.		Místo	Doba zpracování		
					Chlapec	Dívka		Datum	Čas		Datum	Čas	
1	1977	Česká Třebová	Pardubický	A+	0	0	Chlapec	30.11.09	7:52	FN Brno	1.12.09	8:30	A+
2	1981	Šumperk	Olomoucký	0+	0	0	Chlapec	2.12.09	10:20	FN Brno	3.12.09	8:30	B+
3	1981	Svitavy	Pardubický	0-	0	0	Chlapec	6.12.09	21:37	Brno-Obilní Trh	7.12.09	8:30	B-
4	1985	Brno	Jihomoravský	AB+	0	0	Dívka	6.12.09	17:25	FN Brno	7.12.09	9:00	B-
5	1979	Pardubice	Pardubický	A+	0	0	0	10.12.09	10:55	FN Brno	11.12.09	8:30	A+
6	1974	Zlín	Zlínský	AB+	0	0	0	15.12.09	14:00	Zlín	17.12.09	8:30	A+
7	1976	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	0+	0	1	Dívka	15.12.09	21:20	Frýdek-Místek	17.12.09	8:30	0+
8	1986	Brno	Jihomoravský	A-	0	0	Dívka	16.12.09	11:30	FN Brno	17.12.09	8:30	A+
9	1984	Kyjev	Jihomoravský	0+	0	2	Dívka	16.12.09	15:14	Kyjev	18.12.09	8:30	0+
10	1977	Moravská Třebová	Pardubický	A+	1	0	0	21.12.09	19:25	FN Brno	23.12.09	8:00	0+
11	1976	Kyjev	Jihomoravský	0	0	1	Dívka	1.2.10	2:16	Kyjev	2.2.10	17:00	A+
12	1979	Kolín	Středočeský	B-	0	1	Chlapec	1.2.10	2:27	Kyjev	2.2.10	17:00	B-
13	1978	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	A+	0	0	Dívka	31.1.10	11:12	Frýdek-Místek	2.2.10	8:00	A+
14	1981	Hodonín	Jihomoravský	0	0	0	Dívka	1.2.10	17:37	Kyjev	2.2.10	17:00	A+
15	1982	Liberec	Liberecký	0+	0	0	Chlapec	1.2.10	16:54	Kyjev	3.2.10	8:00	0+
16	1974	Brno	Jihomoravský	0+	0	1	0	3.2.10	0:13	FN Brno	4.2.10	8:30	0+
17	1977	Bardějov, Slovensko	Prešovský	A+	1	0	Dívka	2.2.10	7:32	Kyjev	3.2.10	10:30	A+
18	1977	Kyjev	Jihomoravský	A+	0	0	Dívka	2.2.10	12:31	Kyjev	4.2.10	9:00	A+
19	1983	Nový Jičín	Moravskoslezský	B+	0	0	Chlapec	4.2.10	1:22	Frýdek-Místek	5.2.10	8:00	A+
20	1972	Brno	Jihomoravský	A+	0	1	Dívka	8.2.10	12:05	FN Brno	9.2.10	8:00	A+
21	1974	Hodonín	Jihomoravský	A-	0	1	Dívka	8.2.10	18:00	Kyjev	10.2.10	8:30	A+
23	1979	Bojnice, Slovensko	Trenčianský	A+	0	0	Dívka	10.2.10	10:53	Opava	12.2.10	10:30	A+
24	1977	Kyjev	Jihomoravský	A+	0	0	Dívka	10.2.10	16:05	Kyjev	12.2.10	10:30	A+
25	1989	Kyjev	Jihomoravský	0+	0	0	Chlapec	12.2.10	2:47	Kyjev	12.2.10	10:30	0+
26	1989	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	B+	0	0	Dívka	15.2.10	17:25	Brno-Obilní Trh	17.2.10	9:00	A+
27	1979	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	B+	1	0	Dívka	16.2.10	20:17	Frýdek-Místek	18.2.10	8:00	AB+
28	1988	Kyjev	Jihomoravský	A+	1	0	Chlapec	17.2.10	13:03	Kyjev	19.2.10	9:00	A+
29	1974	Vitkov	Moravskoslezský	0+	1	0	Chlapec	17.2.10	17:22	Ostrava-Poruba	19.2.10	9:00	B-
30	1982	Žďár nad Sázavou	Vysočina	AB+	1	0	Dívka	19.2.10	2:32	FN Brno	19.2.10	9:00	A+
31	1979	Havířov	Moravskoslezský	A+	0	0	Chlapec	18.2.10	14:03	Ostrava-Fifejdy	20.2.10	8:30	A+
32	1974	Nový Jičín	Moravskoslezský	B+	1	0	Chlapec	18.2.10	11:40	Frýdek-Místek	20.2.10	8:30	A+
33	1988	Ostrava	Moravskoslezský	0+	0	0	Chlapec	21.2.10	11:37	Frýdek-Místek	23.2.10	8:00	B+
34	1974	Karviná	Moravskoslezský	AB+	1	0	Dívka	23.2.10	15:15	FN Brno	24.2.10	8:30	A-
35	1982	Český Těšín	Moravskoslezský	A+	0	0	Dívka	24.2.10	3:16	Frýdek-Místek	25.2.10	10:00	AB+
36	1980	Vyškov	Jihomoravský	0+	0	0	Chlapec	24.2.10	1:15	Ostrava-Poruba	25.2.10	10:35	A+
37	1970	Vsetín	Zlínský	0-	2	0	Dívka	24.2.10	4:00	Ostrava-Poruba	25.2.10	10:45	0+
38	1978	Valtice	Jihomoravský	A+	0	1	Chlapec	1.3.10	11:07	FN Brno	2.3.10	9:00	A+
39	1983	Martin, Slovensko	Žilinský	0+	0	0	Chlapec	1.3.10	7:44	Frýdek-Místek	3.3.10	8:00	0+
40	1977	Dolný Kubín, Slovensko	Žilinský	A+	0	1	Dívka	2.3.10	12:45	FN Brno	3.3.10	8:00	0+
41	1975	Ostrava	Moravskoslezský	B+	0	0	Chlapec	3.3.10	6:25	Ostrava-Poruba	4.3.10	8:30	B+
42	1985	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	A+	0	0	Dívka	3.3.10	10:12	Frýdek-Místek	5.3.10	8:10	A+
43	1979	Brno	Jihomoravský	0+	0	0	Chlapec	4.3.10	10:40	FN Brno	5.3.10	8:20	0+
44	1982	Třinec	Moravskoslezský	A+	0	0	Dívka	15.3.10	4:45	Ostrava-Poruba	16.3.10	9:00	A+
45	1984	Ostrava	Moravskoslezský	AB+	0	0	Chlapec	30.3.10	18:57	Ostrava-Poruba	1.4.10	8:00	B+
46	1970	Opava	Moravskoslezský	A+	2	1	Chlapec	31.3.10	9:32	Ostrava-Poruba	1.4.10	8:15	A+
47	1976	Kroměříž	Zlínský	AB+	0	0	Chlapec	3.5.10	10:15	Ostrava-Poruba	5.5.10	9:15	AB+
48	1981	Kyjev	Jihomoravský	B+	0	0	Dívka	30.5.10	10:28	Kyjev	1.6.10	8:30	0+
49	1984	Brno	Jihomoravský	0	0	0	0	17.6.10	16:32	FN Brno	18.6.10	9:00	0+
50	1977	Brno	Jihomoravský	B-	1	1	Dívka	20.6.10	6:56	FN Brno	21.6.10	8:45	B-
51	1979	Frýdek-Místek	Moravskoslezský	A-	0	1	Dívka	27.6.10	7:28	Frýdek-Místek	29.6.10	8:30	0+