



**ZBORNICA ZDRAVSTVENE IN BABIŠKE NEGE SLOVENIJE -  
ZVEZA STROKOVNIH DRUŠTEV MEDICINSKIH SESTER, BABIC  
IN ZDRAVSTVENIH TEHNIKOV SLOVENIJE**



**Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov  
v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji**

**47. strokovni seminar**

**SODOBNI PRISTOPI PRI ZDRAVLJENJU  
S KRVJO, CELICAMI IN TKIVI**

**Zbornik z recenzijo**

**Rogla, 17. in 18. maj 2013**

**Naslov**

**Sodobni pristopi pri zdravljenju s krvjo, celicami in tkivi**  
Zbornik predavanj z recenzijo

**Glavna urednica**

Mag.Cvetka Gregorc, VMS, prof. zdr. vzg.

**Programsko uredniški odbor**

Mag.Cvetka Gregorc, VMS, prof. zdr. vzg.,  
Klavdija Peternelj, MSc (KŠ), dipl. m. s.  
dr. Aleksandra Stjepanović Vračar, viš. med. ses., univ. dipl. org.  
Dejan Doberšek, dipl. zn.  
Stana Žlebnik, dipl. m. s.

**Izdala in založila**

Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije - Zveza društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije  
Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji

**Za založnika**

Mag.Cvetka Gregorc, VMS, prof. zdr. vzg.

**Oblikovanje naslovnice**

Irena Buček Hajdarević, dipl. m. s., Andreja Nunar Perko, dipl. m. s.

**Oblikovanje besedila**

Mag.Cvetka Gregorc, VMS, prof. zdr. vzg.

**Naklada**

150 izvodov

**Tehnično urejanje in tisk**

Birografika BORI, d. o. o.

**Leto izdaje**

2013

Avtorji odgovarjajo, da je vsa uporabljena literatura v prispevku navedena v seznamu literature.

Vse pravice pridržane. Prepovedano je sleherno reproduciranje, razmnoževanje, javno predvajanje, tiskanje ali kakršna koli druga oblika objavljanja strani ali izsekov tega zbornika brez pisnega dovoljenja Sekcije MS in ZT v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616.419-089.843(082)  
616.71-018.3-089.843(082)

ZBORNICA zdravstvene in babiške nege Slovenije - Zveza strokovnih društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije. Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji. Strokovni seminar (47 ; 2013 ; Rogla)

Sodobni pristopi pri zdravljenju s krvjo, celicami in tkivi : zbornik predavanj z recenzijo / Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije - Zveza strokovnih društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 47. strokovni seminar, Rogla, 17. in 18. maj 2013 ; [glavna urednica Cvetka Gregorc]. - Ljubljana : Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije - Zveza društev medicinskih sester, babic in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2013

ISBN 978-961-273-066-6

<b>KAZALO</b>	<b>STRAN</b>
<b><i>UVODNA PREDAVANJA</i></b>	<b>1</b>
<b>Zdravljenje s celicami v sodobni transfuzijski medicini</b> izr. prof. dr. Rožman P., dr. med., dr. Jež M., univ. dipl. bioteh.	<b>3</b>
<b>Pridobivanje prostovoljnih nesorodnih dajalcev krvotvornih matičnih celic</b> mag. Tonejc M., dr. med.	<b>9</b>
<b>Pridobivanje in shranjevanje krvotvornih matičnih celic iz popkovnične krvi</b> mag. Cukjati M., dr. med., dr. Domanović D., dr. med., izr. prof. dr. Rožman P., dr. med.	<b>13</b>
<b><i>NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI V KARDIOLOGIJI</i></b>	<b>19</b>
<b>Zdravljenje napredovalega srčnega popuščanja s krvotvornimi matičnimi celicami</b> dr. Poglajen G., dr. med., prof. dr. B. Vrtovec, dr. med.	<b>21</b>
<b>Odvzem krvotvornih matičnih celic pri kardiološkem bolniku</b> Nunar Perko A., dipl. m. s.	<b>26</b>
<b>Presaditev krvotvornih matičnih celic kardiološkemu bolniku z vidika medicinske sestre</b> Ocepek S., dipl. m. s.	<b>33</b>
<b>Presaditev krvotvornih matičnih celic s sistemom NOGA</b> Urbančič H., dipl. zn.	<b>36</b>
<b><i>NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI V ORTOPEDIJI</i></b>	<b>41</b>
<b>Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z gojenimi avtolognimi hondrociti</b> doc. dr. Drobnič M., dr. med., Martinčič D., dr. med.	<b>43</b>
<b>Odvzem krvi in priprava seruma za gojenje avtoloških hondrocitov</b> Nagode Z., dipl. zn., Kovačič Tonejc A. M., dipl. m. s.	<b>47</b>
<b>Gojenje hondrocitov za zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca</b> dr. Kregar Velikonja N., univ. dipl. biol., dr. Barlič A., univ. dipl. biol., dr. Fröhlich M., univ. dipl. biol., doc. dr. Knežević M., univ. dipl. biol.	<b>52</b>
<b>Zdravstvena nega bolnikov ob implantaciji hondrocitov</b> Peruško M., dipl. m. s., Kuplenk T., dipl. m. s.	<b>59</b>
<b><i>NAPREDNO ZDRAVLJENJE S TKIVI V OČESNI KIRURGIJI</i></b>	<b>63</b>
<b>Priprava amnijske membrane za zdravljenje</b> dr. Cirman T., univ. dipl. biol., izr. prof. dr. Erdani Kreft M, univ. dipl. biol..	<b>65</b>
<b>Zdravljenje z amnijsko membrano v očesni kirurgiji</b> asist. mag. Beltram M., dr. med.	<b>71</b>
<b>Odvzem amnijske membrane in zdravstvena nega bolnikov ob presaditvi amnijske membrane</b> Mlakar Tomšič K., dipl. m. s.	<b>75</b>

<b><i>NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI V KIRURGIJI</i></b>	<b>79</b>
<b>Priprava trombocitne plazme za trombocitni gel</b>	<b>81</b>
dr. Cirman T., univ. dipl. biol., mag. Cukjati M., dr. med., dr. Domanović D., dr. med., izr. prof. dr. Rožman P., dr. med.	
<b>Zdravljenje kirurškega bolnika s trombocitnim gelom</b>	<b>87</b>
Semenič D., dr. med., prof. dr. Smrke D. M., dr. med., izr. prof. dr. Rožman P., dr. med.	
<b>Zdravstvena nega kirurških bolnikov zdravljenih s trombocitnim gelom</b>	<b>91</b>
Debelak A., dipl. m. s., univ. dipl. org.	
<b><i>ZDRAVLJENJE S CELICAMI V HEMATOLOGIJI</i></b>	<b>95</b>
<b>Zdravljenje hematoloških bolnikov s presaditvijo krvotvornih matičnih celic</b>	<b>97</b>
Rener K., dr. med.	
<b>Zdravstvena nega hematoloških bolnikov z bolezenijo presadka proti gostitelju</b>	<b>101</b>
Rihtaršič P., dipl. m. s., Halilović J., ZT	
<b>Sodobne tehnike priprave krvnih komponent za bolnike ob presaditvi krvotvornih matičnih celic:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fotofereza</b> <span style="float: right;"><b>105</b></span> Žlebnik S., dipl. m. s.</li> <li>• <b>Odvzem granulocitov s postopkom afereze</b> <span style="float: right;"><b>107</b></span> Žlebnik S., dipl. m. s.</li> <li>• <b>Oprani eritrociti</b> <span style="float: right;"><b>111</b></span> Draksler M., dipl. m. s.</li> <li>• <b>Inaktivacija patogenov v trombocitih</b> <span style="float: right;"><b>115</b></span> Draksler M., dipl. m. s.</li> </ul>	

## **UVODNA PREDAVANJA**



## Zdravljenje s celicami v sodobni transfuzijski medicini

izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med., dr. Mojca Jež, univ. dipl. bioteh.

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
primoz.rozman@ztm.si, mojca.jez@gmail.com

### Povzetek

Celična terapija je zdravljenje z avtolognimi ali alogenskimi celicami. S presajenimi celicami lahko nadomestimo manjkajoče ali obolele celice oziroma njihove sestavine, ali pa z njimi dosežemo druge terapevtske učinke, kot so spremembe imunskega sistema, napad na rakave celice, itd. Najbolj razširjena oblika celičnega zdravljenja je presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC), s katero zdravimo številne, večinoma hematološke bolezni. Pri tem izkoriščamo tudi protitumorski učinek presadka. Kot vir KMC je periferna kri v veliki meri nadomestila kostni mozeg. Dosegljivost darovalcev se je močno izboljšala zaradi ustanovitve registrov prostovoljnih darovalcev. Primeren vir alogenskih KMC je tudi popkovnična kri, ki je široko dostopna, donorju ne prinaša tveganj in povzroča manj bolezni presadka proti gostitelju, kar omogoča uporabo bolj neskladnih celic. Terapije s specifičnimi populacijami levkocitov omogočajo tako selektivne protitumorske učinke (citotoksični limfociti T, naravne celice ubijalke) kot zaviranje bolezni presadka proti gostitelju ter avtoimunosti (mezenhimske celice, regulatorne T-celice). Terapija s presaditvijo matičnih celic se bo v prihodnosti najverjetneje uporabljala tudi za zdravljenje bolezni kot so Parkinsonova bolezen, sladkorna bolezen, artritis, multipla skleroza in kardiovaskularne bolezni. Sedanje tehnike in raziskave nakazujejo, da bodo celične terapije kmalu začeli široko uporabljati v vseh vejah klinične medicine.

**Ključne besede:** *krvotvorne matične celice, imunoterapija, celične terapije, hematološke bolezni, popkovnična kri, kostni mozeg, stimulirana periferna kri*

### Uvod

Najstarejši način zdravljenja s celicami je pravzaprav transfuzija krvi, vendar pod pojmom celična terapija danes razumemo zdravljenje z avtolognimi ali alogenskimi celicami, ki po presaditvi ohranijo svoje funkcionalne značilnosti in pri bolniku z njimi izzovemo željene učinke, bodisi da z njimi nadomestimo manjkajoče celice ali njihove sestavine, ali pa z njimi dosežemo druge neposredne terapevtske učinke, kot so npr. spremembe imunskega sistema, napad na rakave celice (Rožman in Jež, 2011).

### Presaditev krvotvornih matičnih celic

Najstarejša in najbolj učinkovita celična terapija je presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC). Prvo presaditev sorodniških KMC za zdravljenje levkemije je opravil dr. E. Donnall Thomas leta 1957 in za razvoj tega načina zdravljenja prejel tudi Nobelovo nagrado leta 1990. Danes je moč z rutinsko presaditvijo KMC zdraviti več kot 70 malignih in nemalignih bolezni. Uspešnost zdravljenja je pri bolnikih z optimalnimi pogoji dosegla več kot 90-odstotkov. Letno opravijo na svetu več kot 50.000 presaditev KMC (EBMT, 2013).

Presaditev KMC je trenutno še vedno glavna terapevtska in pogosto edina možnost za ozdravitev pri različnih hematoloških boleznih (Preglednica 1). Leta 2013 praznujemo že milijonto presaditev KMC.

Preglednica 1: Standardne indikacije za presaditev krvotvornih matičnih celic (povzeto po EBMT)

Presaditev alogenskih KMC	Presaditev avtolognih KMC
Akutna mieloična levkemija: z visokim tveganjem/relaps	Akutna mieloična levkemija: z visokim tveganjem/relaps
Akutna limfoblastna levkemija: z visokim tveganjem/relaps	Ne-Hodgkinov limfom, visok gradus/relaps
Kronična mieloična levkemija	Hodgkinova bolezen: relaps
Mielodisplastični sindromi	Multipli mielom
Aplastična anemija	Rak zarodnih celic: relaps
Talasemija major	Ewingov sarkom: z visokim tveganjem/relaps
Primarne imunske pomankljivosti	

Zaradi raznolikosti sistema HLA (Human Leukocyte Antigens) ima bolnik, ki nima HLA-identičnih sorojencev, le malo možnosti, da bi mu med naključnimi osebami našli skladnega dajalca KMC. Zato so se v mednarodni skupnosti zdravniki odločili za ustanovitev večjih registrov tipiziranih prostovoljnih darovalcev KMC. Danes je po vsem svetu v mednarodnih registrih vpisanih več kot 20 milijonov prostovoljnih darovalcev KMC. Posledično se je razpoložljivost darovalcev iz 25-40 odstotkov povečala na 70-80 odstotkov in več. Podatki iz Svetovnega združenje darovalcev kostnega mozga kažejo, da skoraj polovica presaditev KMC opravijo s pomočjo nesorodnih dajalcev (WMDA, 2013).

Izvirni koncept presaditve alogenskih matičnih celic je obsegal izkoreninjenje gostiteljevih mieloičnih in limfatičnih celic z uporabo velikih odmerkov citotoksičnih zdravil in obsevanjem pred infuzijo KMC darovalca, kar imenujemo tudi »kondicioniranje« bolnika. Dolgo so menili, da je takšno popolno uničenje (mieloablativna terapija) gostiteljevega krvotvornega in imunskega sistema nujno za ozdravitev rakave bolezni, poleg tega pa tudi za zmanjšanje nevarnosti zavrnitve presadka. Poleg zavrnitve presadka pa je glavni zaplet pri presaditvi alogenskih KMC imunska reakcija imenovana bolezen presadka proti gostitelju (Graft Versus Host Disease – GVHD), ki je najpogostejši razlog za umrljivost po presaditvi. Napredek v transplantacijski imunologiji je razjasnil tudi vlogo darovalčevih imunskih celic pri prijemanju presadka in preprečevanju ponovitve bolezni preko učinka presadka proti tumorju (GVT – Graft-Versus-Tumor). Občutljivo ravnotežje med želenimi in škodljivimi imunskimi učinki presadka je postalo področje intenzivnega raziskovanja, iz katerega je nastal tudi nov koncept nemieloablativne presaditve KMC, pri katerem pred presaditvijo sicer uporabimo imunosupresivno terapijo, ki pa ne uniči imunskega sistema bolnika v celoti (nemieloablativna terapija) ter tako po presaditvi dobimo mešani himerizem, ki zmanjša možnost nastanka bolezni GVHD.

Možna je tudi presaditev lastnih KMC ali avtologna transplantacija. Presaditev avtolognih KMC opravimo po kondicioniranju zaradi tega, ker sta zvečani odmerek kemoterapije in obsevanje toksična za kostni mozeg. Že pred kemoterapijo zberemo KMC pacienta, jih zamrznemo in nato z infuzijo po končani intenzivni kemo/radioterapiji vrnemo. V teh okoliščinah imunske neskladnosti ni, sporna ostaja edino možnost reinfuzije prikritih malignih celic. Obstajajo različne kemični in imunološki načini za odstranjevanje tumorskih celic iz presadka, toda njihova klinična učinkovitost ni jasna.

Več let je bil edini vir KMC kostni mozeg, ki so ga pridobili z igelno aspiracijo iz zadnjega trna črevnice v splošni anesteziji. Aspiracija kostnega mozga je sicer postopek z majhnim tveganjem, a so bili opisani tudi resni neželeni učinki. Danes KMC najpogosteje zbiramo s citafereznimi postopki iz periferne krvi po njihovi mobilizaciji s kemoterapijo in hematopoetskimi rastnimi dejavniki (npr. G-CSF – *granulocyte colony-stimulating factor* in GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Leta 2003 je bila v Evropi periferna kri vir KMC pri 97 % avtolognih presadkov in 65 % alogenskih presadkov. Vzrok za to hitro spremembo zbiranja KMC iz periferne krvi je bilo poleg hitrejše regeneracije nevtrofilcev in trombocitov tudi dejstvo, da je za darovalca zbiranje KMC mnogo ugodnejše (Preglednica 2) (EBMT, 2013).

Preglednica 2: Prednosti in slabosti presaditve matičnih celic iz periferne krvi v primerjavi s presaditvijo kostnega mozga.

Prednosti	Slabosti
Višje število celic CD34+	Uporaba mobilizacijskih agensov
Nižji stroški v primerjavi s pridobivanjem KMC iz kostnega mozga	Večje tveganje kronične bolezni presadka proti gostitelju (GVHD)
Lažje zbiranje	Venski dostop je lahko problem
Hitrejša regeneracija nevtrofilcev in trombocitov	Vprašljivo
Hospitalizacija in splošna anestezija nista potrebni	Izboljšanje preživetja

Rastni dejavnik G-CSF, ki se uporablja za mobilizacijo ima malo resnih neželenih učinkov, pogosto pa povzroča bolečine v kosteh, glavobol in utrujenost. Strahovi, da bi G-CSF lahko stimuliral speče levkemične klonse, se zaenkrat niso uresničili. Novi mobilizacijski agens (AMD3100 - Plerixafor) izkorišča specifične mobilizacijske mehanizme in bo v prihodnosti lahko imel pomembno vlogo.

Na hitrost regeneracije krvotvornega sistema po presaditvi najbolj vpliva število infundiranih celic. Molekula CD34 ali sialomucin je glavni označevalec KMC. Da po avtologni presaditvi KMC iz periferne krvi pride do regeneracije nevtrofilcev in trombocitov v roku 10-14 dni, je potrebno transplantirati vsaj  $2 \times 10^6$  KMC/kg, še bolje pa  $5 \times 10^6$  KMC/kg. Če je pri presaditvi alogenskih KMC število celic CD34+ manjše od  $2 \times 10^6$ /kg, to povzroči višjo umrljivost. Večina transplantacijskih centrov zahteva vsaj  $4 \times 10^6$  CD34+ celic/kg za presaditev alogenskih KMC (Apperley in sod., 2012).

Sredi 90-ih je postala primeren vir alogenskih KMC tudi popkovnična kri (PK). Za darovalko odvzem PK ne predstavlja nobene nevarnosti, ker gre za kri iz popkovnice, ki jo sicer zavržemo. V PK ni latentnih virusov, npr. citomegalovirusa (CMV) in virusa Epstein-Bar (EBV). Poleg tega povzroči PK manj pojavov bolezni GVHD, kar omogoča uporabo popkovnične krvi za bolnike, ki so s prejemnikom neskladni kar v dveh glavnih HLA-antigenih (Human Leukocyte Antigens). Kljub nizkemu absolutnemu številu MC v popkovnični krvi in posledično zapoznili hematološki in imunski regeneraciji uporaba PK ni več omejena le na pediatrične paciente (Rožman in sod. 2012a in 2012b).

V zadnjih letih so dvojne presaditve PK in drugi načini presaditve pri odraslih obšli problem nizkega števila MC. Ekspanzija celic *ex vivo* bi lahko v prihodnosti še nadalje razširila področje presaditev celic iz PK. Do konca leta 2011 je bilo opravljenih že 25.000 presaditev PK, izsledki pa so spodbudni. Zamrzovanje omogoča shranjevanje KMC, ki ostajajo viabilne in sposobne regeneracije kostnega mozga, za nedoločen čas, zagotovo vsaj za 5-10 let (Slika 1) (WMDA, 2013).



Slika 1: A) Kontrolirano zamrzovanje popkovnične krvi. B) Skladiščenje KMC v posodah s tekočim dušikom.

Vir: Javna banka popkovnične krvi, ZTM Ljubljana

Pripravke KMC lahko tudi obdelamo tako, da odstranimo ali izberemo določene celične sestavine. Pred zamrzovanjem kostni mozeg ali PK predelamo do enojdrne celične frakcije, ki vsebuje KMC. S tem zmanjšamo volumen pripravka, odstranimo eritrocite in večino plazme in zato ga lahko uporabimo tudi v primeru neskladja ABO. Za preprečevanje bolezni GVHD lahko iz pripravka KMC iz periferne krvi ali kostnega mozga odstranimo tudi T-limfocite.

## Imunoterapija

Zdravniki in znanstveniki so razvili številne načine, kako usmeriti imunske celice ali protitelesa, da prepoznajo in uničijo rakave ali z virusom okužene celice. Imunoterapijo lahko razdelimo na:

- *Aktivno imunoterapijo*, kjer stimuliramo bolnikov lastni imunski odziv
- *Pasivno imunoterapijo*, kjer imunost pridobimo z vnosom limfocitov (celična imunoterapija) ali protiteles (humoralna imunoterapija) s protitumorsko reaktivnostjo.

Pri zdravljenju levkemije so zdravniki sprva skušali vzpodbuditi bolnikovo lastno protitumorsko imunost s pomočjo imunizacije z levkemičnimi blastnimi celicami med remisijo. Potem so ugotovili, da lahko pri zdravljenju kronične mieloične levkemije (KML) dosežejo močan učinek presadka proti levkemiji z infuzijo darovalčevih levkocitov. Kasneje se je izkazalo, da so bile infuzije darovalčevih levkocitov učinkovite pri 75 odstotkih bolnikov s KML. Odziv pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML) in akutno limfoblastno levkemijo (ALL) je na tako terapijo mnogo manjši (manj kot 25 %) (Apperley in sod., 2012).

## *Limfociti T*

Levkemija in druge vrste malignomov se med drugim razvijejo zaradi tega, ker jih imunski sistem slabo prepoznava, kajti rakave celice slabše izražajo določene antigene. Da bi jih efektorske celice, npr. limfociti T ali naravne celice ubijalke (NK) lahko ubile, morajo tumorske celice izražati antigena kot sta CD80 in CD54.

Dendritske celice predelajo tumorske peptide in jih vezane na antigene HLA na svoji površini predstavljajo preko T-celičnega receptorja (TcR), s čimer aktivirajo celice T.

Drugi ali ko-stimulatorni signal pride preko vezave molekul CD80 in CD40 na dendritskih celicah z ligandoma CD28 in CD40 na celicah T. Rezultat tega je produkcija limfokinov, kot sta interleukin (IL) 12 in IL-2. Celice T se namnožijo in prepoznavajo tumorske celice kot tuje. Če manjka eden izmed ko-stimulatornih signalov, se razvije stanje tolerance (Bastien in sod., 2012; Kennedy-Nasser in Bollard, 2007).

### ***Tumorska "vakcinacija"***

Pri bolnikih s čvrstimi tumorji je vodilni pristop imunske terapije s celicami tak, da jih imuniziramo z avtolognimi dendritičnimi celicami, ki jih pred tem napolnimo s tumorskimi antigeni (t.i. *tumor-loaded dendritic cells*). Te celice nato predstavijo tumorske antigene bolnikovim celicam T. Slednje s tem postanejo citotoksične za tumorske celice (citotoksični limfociti T - CTL) (Loewendorf in Csete, 2013).

### ***Naravne celice ubijalke***

Naravne celice ubijalke so sposobne prepoznati tumorske in z virusi okužene celice. Nimajo sicer receptorjev TcR, izražajo pa druge receptorje, kot so npr. inhibitorni ubijalski imunoglobulinu-podobni receptorji KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*), ki prepoznavajo molekule HLA razreda I A in B. Če obstoja neujemanje med darovalcem in bolnikom, lahko naravne celice ubijalke prepoznajo tuje molekule HLA in ubijejo rezidualne levkemične celice – učinek GvL. Z aloreaktivnimi naravnimi celicami ubijalkami lahko uničimo večino levkemičnih celic pri KML in AML, medtem ko lahko uničimo le manjšino celic pri ALL (Rettinger in sod., 2012).

### ***Regulatorne celice T***

Te celice so bistvene za periferno toleranco do lastnih antigenov. Izražajo molekule CD4, CD25 in protein Foxp3 ter delujejo preko celično-celičnega stika. Lahko povzročijo aktivacijo aloreaktivnih celic T in posledično efekt GvL, preprečujejo pa množično razmnoževanje celic T, ki povzročajo GVHD. V skladu s tem je pri bolnikih z višjimi vrednostmi T-regulatornih celic po presaditvi KMC verjetnost nastanka GVHD manjša (Michael in sod., 2013).

Imunoterapija se v kliniki uporablja:

- Za zdravljenje levkemije, za kar razvijajo številne metode za gojenje citotoksičnih limfocitov T z antilevkemično aktivnostjo.
- Pri presaditvi KMC. Darovalčevi limfociti se uporabljajo pri relapsu pri bolnikih s KML, akutno levkemijo in multiplim mielomom. Virusno specifične CTL lahko infundiramo bolnikom s potransplantacijskimi okužbami. Za zmanjšanje GVHD lahko uporabimo T-regulatorne celice.
- Pri zdravljenju čvrstih tumorjev. Bolniki z rakom ledvic, jeter, prostate in malignim melanomom trenutno dobivajo dendritske celice napolnjene s tumorskimi antigeni.

### **Zaključek**

Povečanje števila darovalcev različnih celic, širša uporaba mobiliziranih krvnih celic iz periferne in popkovnične krvi ter presaditve z ne-mieloablativnim kondicioniranjem predstavljajo pomemben napredek na področju presaditev KMC, ki je omogočil večjo varnost in dostopnost teh terapij večjemu številu bolnikov. Na področju zdravljenja je prišlo do spremembe paradigme od mieloablacije prejemnikovih celic k manipulaciji imunskih mehanizmov, ki spodbudijo prijetje presadka, izkoristijo antitumorski potencial

presadka ter preskrbijo efektorske celice, ki so se sposobne boriti proti povzročiteljem infekcij.

KMC in druge vrste matičnih celic iz kostnega mozga, maščobe in popkovnične krvi se lahko uporabljajo tudi v regenerativne namene, saj se lahko diferencirajo v živčne, srčno-mišične, jetrne, epiteljske in kožne celice. Terapija s presaditvijo matičnih celic se bo v prihodnosti iz področja hematologije in onkologije preselila tudi na druga področja, najverjetneje se bo uporabljala tudi za zdravljenje bolezni kot so Parkinsonova bolezen, sladkorna bolezen (Jun, 2010), multipla skleroza (Capello in sod., 2009) in kardiovaskularne bolezni (Vrtovec in sod., 2013, Šimc in sod. 2012).

## Literatura

1. Anisimov SV (2009). Cell therapy for Parkinson's disease: II. Somatic stem cell-based applications. *Advances in Gerontology*, 22(1), 150-66.
2. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. (Eds.). (2012). *The EBMT Handbook - Haematopoietic Stem Cell Transplantation* (p. 683). European School of Haematology.
3. Bastien J-P, Roy J, Roy DC (2012). Selective T-cell depletion for haplotype-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *Seminars in oncology*, 39(6), 674-82.
4. Capello E, Vuolo L, Gualandi F, Van Lint MT, Roccatagliata L, Bonzano L, Pardini M, et al. (2009). Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis: benefits and risks. *Neurological sciences*, 30 Suppl 2, S175-7.
5. EBMT, European Group for Blood and Marrow Transplantation, uradna spletna stran. Dostopno na: [www.ebmt.org](http://www.ebmt.org) (citirano: 19. 4. 2013).
6. Jun H-S (2010). Cell replacement and regeneration therapy for diabetes. *Korean diabetes journal*, 34(2), 77-83.
7. Kennedy-Nasser AA, Bollard CM (2007). T cell therapies following hematopoietic stem cell transplantation: surely there must be a better way than DLI? *Bone marrow transplantation*, 40(2), 93-104.
8. Loewendorf A, Csete M (2013). Concise review: immunologic lessons from solid organ transplantation for stem cell-based therapies. *Stem cells translational medicine*, 2(2), 136-42.
9. Michael M, Shimoni A, Nagler A (2013). Recent compounds for immunosuppression and experimental therapies for acute graft-versus-host disease. *The Israel Medical Association journal*: IMAJ, 15(1), 44-50.
10. Rožman P, Jež M (2011). Matične celice in napredno zdravljenje, pojmovnik (p. 289). Celjska Mohorjeva družba.
11. Rožman P, Domanovič D, Knežević M. Shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi - danes in jutri. *Zdrav Vestn*, 2012a, letn. 81, št. 1, str. 44-53.
12. Rožman P, Jazbec J, Domanovič D. Presaditve matičnih celic iz popkovnične krvi - dve desetletji kliničnih izkušenj. *Zdrav Vestn.*, 2012b, letn. 81, št. 5, str. 413-421.
13. Rettinger E, Kuçi S, Naumann I, Becker P, Kreyenberg H, Anzaghe M, Willasch A, et al. (2012). The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells. *Cytherapy*, 14(1), 91-103.
14. Šimc M, Strbad M, Jež M, Rožman P. Zdravljenje z matičnimi celicami. *Zdrav Vestn.*, sep. 2012, letn. 81, št. 9, str. 634-644.
15. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, et al. (2013). Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circulation research*, 112(1), 165-73.
16. WMDA, World Marrow Donor Association, uradna spletna stran. Dostopno na: <http://www.worldmarrow.org/> (citirano: 23. 4. 2013).

## **Pridobivanje prostovoljnih nesorodnih dajalcev KMC**

**mag. Miha Tonejc, dr. med.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

### **Izvleček**

Presajanje krvotvornih matičnih celic (KMC) se je v zadnjih desetletjih uveljavilo kot najuspešnejši način zdravljenja poprej večinoma neozdravljivih bolezni krvotvornih organov, predvsem različnih vrst levkemij.

Kriterij za izbiro primerne darovalca KMC je tkivna skladnost oziroma ujemanje v tkivnih antigenih HLA (Human Leukocyte Antigens) s prejemnikom presadka. Najustreznejši darovalec je bolnikov najožji sorodnik (brat, sestra), ki je z njim v omenjenih antigenih genotipsko skladen.

Ker pa večina bolnikov ( $\approx 75\%$ ) med najožjimi družinskimi člani nima ustreznih, HLA skladnih sorodnih darovalcev, obstaja v določenih primerih možnost, da le-te poiščemo med prostovoljnimi nesorodnimi osebami, ki so člani svetovnega registra - Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). Vanj je vpisanih okrog 21 milijonov darovalcev. Vanj je vključen tudi slovenski register Slovenija Donor (SD), ki predstavlja anonimno zbirko fenotipov HLA trenutno 15526 slovenskih prostovoljnih nesorodnih darovalcev KMC (NDKMC). Delovanje slovenskega registra NDKMC je v celoti vpeto v nacionalni in mednarodni program presajanja alogenskih KMC.

**Ključne besede:** *register Slovenija Donor, darovalci, krvotvorne matične celice, presajanje, transplantacijski center, odvzemni center, standardi*

### **Uvod**

Leta 1989 so na Hematološkem oddelku Kliničnega Centra (KC) v Ljubljani opravili prvo uspešno avtologno ter prvo uspešno sorodno alogensko presaditev kostnega mozga. Šele konec leta 2002 pa so izvedli tudi prvo transplantacijo KMC prostovoljnega nesorodnega darovalca.

Slovenski register Slovenija-Donor smo na pobudo prof. dr. Mateje Bohinjec ustanovili v Centru za tipizacijo tkiv (CTT) konec leta 1991. Že leta 1992 je postal polnopravni član svetovnega registra BMDW. Register BMDW so ustanovili v letih 1988-1989 v Leidnu, na Nizozemskem. Njegov ustanovitelj je prof. dr. Jon van Rood. Vanj je trenutno vključenih 117 registrov NDKMC in bank pokrovnične krvi.

### **Kdo je lahko darovalec KMC**

Obvezno mora izpolnjevati naslednje pogoje: starost od 18 do 55 let, popolnoma zdrav, torej brez kroničnih telesnih in/ali psihičnih bolezni ter mora v celoti izpolnjevati tudi vse ostale predpisane zahteve, ki veljajo za krvodajalce v RS in so opredeljene v Zakonu o preskrbi s krvjo. Darovalec je lahko vsakdo, ki se prostovoljno odloči za darovanje svojih KMC za potrebe kateregakoli bolnika, kjerkoli v svetu in to tudi pisno potrdi (1, 2, 3, 4).

## **Pristop k potencialnemu darovalcu**

Darovalca moramo obvezno seznaniti z: indikacijami za presaditev KMC; uspehi in morebitnimi posledicami tovrstnega zdravljenja, s postopki odvzema KMC in možnimi spremljajočimi zapleti; s sistemom tkivnih antigenov HLA ter imunogenetskimi merili, ki so pogoj za uspešno presaditev; z razlogi za presajanje KMC nesorodnih darovalcev; s postopkom in stroški tipizacije HLA ter iskanja v svetovnem (BMDW) in posameznih nacionalnih registrih NDKMC kakor tudi s pravicami članov registra SD in z načinom uporabe podatkov o njihovih fenotipih HLA. Izpolniti mora anketo o svojem zdravstvenem stanju in življenjskih navadah ter se pogovoriti z zdravnikom. Darovalec mora vedno pisno potrditi, da je prebral ves razpoložljivi informativni material o nalezljivih boleznih, ki se lahko prenašajo s presaditvijo KMC ter prav tako pisno privoliti v odvzem krvnih vzorcev za tipizacijo antigenov HLA in testiranje virusnih in drugih markerjev, ki je obvezno pred vključitvijo v register SD. Prav tako mora tudi pisno potrditi, da se strinja z vpisom v register, in sicer do dopolnjene starosti 55 let, ko mu članstvo avtomatično poteče ter izjavo, da se je za ta korak odločil prostovoljno, zavedajoč se dejstva, da je darovanje KMC anonimno in brezplačno. Neodtujliva pravica slehernega darovalca pa je, da lahko v vsakem trenutku in brez kakršnihkoli posledic zanj izstopi iz postopka izbire. Na darovalca nikoli ne smemo izvajati nikakršnih pritiskov (5).

## **Registracija darovalca**

Pod ustrezno šifro v register SD vpišemo fenotipe tkivnih antigenov HLA darovalcev ter podatke posredujemo tudi v BMDW.

## **Zagotavljanje anonimnosti in varnosti osebnih podatkov**

Vsi podatki morajo biti ustrezno varovani (gesla, kriptiranje), pisne dokumente ter elektronske kopije pa moramo obvezno hraniti v zaklenjenih železnih omarah. Podatkov, ki so shranjeni v registru nikoli ne smemo uporabiti v namene, za katere darovalec predhodno ni dal pisne privolitve (5, 3).

## **Zaščita darovalcev**

Darovalci vsakič darujejo svoje KMC le za enega bolnika. Tekom celotnega postopka morajo biti ustrezno zdravstveno zavarovani (1, 6, 7).

## **Iskanje NDKMC v registru Slovenija-Donor za bolnike iz tujine**

Iskanje za bolnike iz drugih držav v nacionalnem registru SD obravnavamo le, če zahteve zanje pošljejo registri, ki so člani BMDW. Register Slovenija-Donor je odgovoren za to, da ugotovi, da darovalec ob vsakem nadaljnjem testiranju izpolnjuje vse predpisane pogoje. Register Slovenija-Donor, skladno z naročilom tujega registra naroči tipizacije različnih lokusov HLA razreda I in/ali II v CTT. V večini primerov pa register potem, ko dobi iz tujega registra zahtevo za vzorec polne krvi izbranega, tkivno skladnega nesorodnega darovalca, ki ga le-ta potrebuje za izvedbo potrditvene tipizacije. Krvni vzorec, kasneje pa

še rezultate omenjenih preiskav, SD pošlje v ustrežni register. Če tuji register ne sporoči svoje odločitve o dokončni izbiri našega darovalca v roku 90 dni po začetku dokončne izbire, SD ponovno sprostí njegovo predhodno rezervacijo. Register SD mora obvezno obvestiti darovalca o odločitvi glede njegove (ne)izbire (2).

### **Tkivna skladnost**

Pri ugotavljanju tkivne skladnosti dvojice praviloma SD ravna skladno z lastnimi, ali pa uporabi minimalne kriterije, ki jih predpisuje World Marrow Donor Association (WMDA). V določenih primerih mora upoštevati tudi dogovore sprejete v okviru Konzilija transplantacijskega centra.

Genska tipizacija HLA-A\*, -B\*, Cw\*, DRB1\* in DQB1\* na nivoju visoke ločljivosti je pri nas minimalni pogoj za določitev ustrežne tkivne skladnosti med bolnikom in NDKMC (9).

### **Postopek iskanja NDKMC za našega bolnika v tujih registrih**

Najprej v CTT tipiziramo bolnikovo ožjo in kadar je to smiselno tudi širšo družino, da bi našli ustrežnega sorodnega darovalca KMC. Kadar na ta način ne najdemo ustrežnega darovalca, sprožimo postopek iskanja NDKMC za posameznega bolnika v registru SD.

V izbranem registru naročimo dodatne tipizacije, praviloma na visoki stopnji ločljivosti, tistih antigenov HLA, ki so potrebni za ugotovitev minimalne zahtevane tkivne skladnosti dvojice bolnik-darovalec, in sicer vsakič za 5 do 10, z bolnikom najbolj tkivno skladnih darovalcev, naenkrat. Ko v SD prispejo rezultati naročenih tipizacij HLA izberemo skladne darovalce. Potrditvene tipizacije bolnika in izbranih darovalcev izvedemo na stopnji visoke ločljivosti na nivoju DNK.

Odvzem matičnih celic lahko transplantacijski center naroči le za takojšnjo transplantacijo in ne za njihovo krioprezervacijo (2, 5).

### **Priprave na odvzem KMC**

Pred začetkom postopka dokončne izbire moramo darovalca natančno seznaniti z vsemi nadaljnimi potrebnimi preiskavami, načini odvzema KMC ter s tem povezanimi tveganji, kakor tudi s predvidenim časom, ki ga bo moral za to porabiti ter z dejstvom, da ga morda lahko prosijo za ponovno darovanje za istega bolnika. Darovalec mora pisno potrditi, da je seznanjen s celotnim potekom postopka, še posebej pa, da se zaveda, da lahko bolnik v fazi priprave na presaditev umre, če si darovalec v tem času premisli in odstopi od darovanja KMC. Darovalec, ki v celoti izpolnjuje pogoje za odvzem KMC mora svojo popolnoma prostovoljno odločitev o darovanju potrditi z lastnoročnim podpisom ustrežnega predpisanega obrazca (5).

**Odvzem KMC** opravimo lahko le v primeru upravičenega zdravljenja s presaditvijo KMC (4, 8).

**Transport odvzetih KMC** moramo opraviti na najhitrejši možni način, tako, da od časa odvzema do presaditve ne mine več kot 24 ur. Transport KMC lahko opravi le za to posebej usposobljeno osebje (6).

#### **Spremljanje darovalca po opravljenem odvzemu KMC**

Po odvzemu KMC mora odgovorni zdravnik centra za odvzem poskrbeti za dobro počutje in ustrezno zdravstveno stanje darovalca. Če je to potrebno, darovalca ustrezno medicinsko oskrbi. Darovalca spremlja do njegove popolne rehabilitacije (6).

#### **Morebitni ponovni odvzem KMC pri istem darovalcu**

Kadar presaditev ne uspe lahko darovalca prosimo, da še enkrat daruje za istega bolnika (6).

#### **Zaključek**

Dokončna odločitev o izboru NDKMC in presaditvi njegovih KMC je v pristojnosti lečečega zdravnika specialista – hematologa transplantacijskega centra.

#### **Literatura**

1. Zakon o odvzemu in presaditvi delov človeškega telesa zaradi zdravljenja – ZOPDCT (Uradni list RS, št. 12/11.2.2000/stran 1569).
2. Pravilnik o načinu delovanja in pogojih za razvoj nacionalnega programa zdravljenja s presaditvijo KMC in načinu delovanja registra nesorodnih dajalcev KMC (Uradni list RS, št.75/1.8.2003/stran 11368).
3. Pravilnik o načinu varstva osebnih podatkov dajalcev in prejemnikov delov človeškega telesa zaradi zdravljenja (Uradni list RS, št. 75/1.8.2003/ stran 11369).
4. Pravilnik o postopkih zbiranja, shranjevanja in uporabe KMC (Uradni list RS, št.104/27.10.2003/stran 14525).
5. Rosenmayr A, Hartwell L, Egeland T. Informed Consent - suggested procedures for informed consent for unrelated haematopoietic stem cell donors at various stages of recruitment, donor evaluation, and donor workup, *Bone Marrow Transplantation* (2003) 31, 539–545.
6. Cleaver A et al. Donor work-up and transport of bone marrow - recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world from the Donor Registries and Quality Assurance Working Groups of the World Marrow Donor Association (WMDA), *Bone Marrow Transplant* 1997, 20: 621-629.
7. <http://www.worldmarrow.org/>
8. The EBMT Handbook 5th edition, Haematopoietic Stem Cell Transplantation, 2008.
9. Hurley C. et al., A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors, *Tissue Antigens* 1999, 53: 394-406; *Human Immunology* 1999, 60: 347-406; *Bone Marrow Transplant* 1999, 24: 119-121.

## **Pridobivanje in shranjevanje krvotvornih matičnih celic iz popkovnične krvi**

**mag. Marko Cukjati, dr. med.<sup>1</sup>, dr. Dragoslav Domanović, dr. med.<sup>2</sup>,  
izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Švedska  
marko.cukjati@ztm.si, primoz.rozman@ztm.si

### **Izveček**

Popkovnična kri (PK) je bogat vir matičnih celic. Vsebuje tako krvotvorne kot mezenhimske matične celice, ki postajajo zanimive za uporabo v regenerativni medicini. Javne banke popkovnične krvi shranjujejo že več kot 570.000 enot PK, ki so povezane v mednarodne registre PK. Po ocenah je še večje število shranjenih avtolognih enot PK v zasebnih bankah. Večina strokovnih združenj ne podpira shranjevanja v avtolognih bankah z vidika obstoječih indikacij za presajanje krvotvornih matičnih celic (KMC). Avtologna PK ima potencialni pomen na področju razvijajoče se regenerativne medicine. V Sloveniji deluje javna banka popkovnične krvi v okviru Zavoda RS za transfuzijsko medicino, v kateri je bilo konec leta 2012 shranjenih 859 enot. Od odvzetih enot PK se v javno banko shranijo le tiste, ki izpolnjujejo stroge zahteve kakovosti.

**Ključne besede:** *popkovnična kri, darovanje, banka, register, presaditev*

### **Uvod**

Matične celice (MC) so nediferencirane celice, ki jih v majhnem številu najdemo v različnih tkivih in organih odrasle osebe in imajo do določene mere sposobnost samoobnavljanja in ustvarjanja potomk, ki se diferencirajo v specializirane celice tkiva oziroma organa (1). Najosnovnejša je embrionalna matična celica, iz katere nastanejo tkivne matične celice, ki jih najdemo v številnih tkivih odraslega človeka. Krvotvorne in mezenhimske matične celice so prisotne v plodovi krvi, ki jo lahko po porodu iztisnemo iz popkovnice.

V posteljici po porodu ostane od 50 do 150 mL popkovnične krvi (PK), iz katere lahko osamimo KMC in jih uporabimo za avtologno ali alogensko zdravljenje s presaditvijo, podobno kot KMC odraslega, ki jih osamimo iz kostnega mozga ali periferne krvi. Za razliko od KMC odrasle osebe imajo KMC iz PK precej boljši delitveni potencial, manjše število mutacij in daljše telomere, žal pa njihovo uporabnost omejuje relativno majhno število v primerjavi s številom KMC, ki jih lahko pridobimo od odraslega dajalca.

PK ima v primerjavi s kostnim mozgom ali periferno krvjo več prednosti je enostaven način pridobivanja, ki ne predstavlja tveganja za mater ali novorojenca. Pri zbiranju PK tudi ni nevarnosti za dajalca, saj nista potrebna boleča punkcija kostnega mozga v splošni anesteziji oz. aplikacija rastnih dejavnikov in postopek afereze.

Za razliko od odraslih darovalcev KMC, pri katerih se odvzem celic opravi šele neposredno pred presaditvijo, pa je pridobivanje KMC iz PK omejeno na čas neposredno po porodu, ko je potrebno zbrano PK v roku 48-ih ur obdelati in zamrzniti. Zamrznjeni pripravki se lahko hranijo v tekočem dušiku ali parah tekočega dušika več let in so na razpolago takoj, ko je potrebna presaditev KMC.

Prva uspešna presaditev popkovnične krvi je bila izvedena pri otroku s hudo obliko Fanconijeve anemije (2). Danes zdravljenje s presaditvijo alogenskih KMC iz PK pomembno dopolnjuje uveljavljene načine s presajanjem KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi (3). Zaradi sorazmerno majhnega števila matičnih celic v PK so se prve presaditve izvajale predvsem pri otrocih. Manjše število KMC v presadku je povezano zakasnelim delovanjem presadka in pogostejšo odpovedjo presadka. V zadnjih letih se je pri zdravljenju odraslih bolnikov uveljavila hkratna presaditev dveh ali celo treh enot PK (4).

Za uspešno presaditev KMC iz PK je ključno visoka stopnja ujemanja v transplantacijskih antigenih HLA (Human Leukocyte Antigens), zlasti v šestih alelih, to je HLA-A, -B in -DRB1 (6/6). Manjša kot je stopnja ujemanja, pogosteje se razvije akutna in kronična bolezen presadka proti gostitelju (GvHD). V primeru KMC iz PK je pogostnost GVHD bistveno manjša, zato je dopustna tudi večja stopnja neujemanja v HLA antigenih (4/6), kar povečuje verjetnost, da se najde ustrezna enota (5, 6).

### **Banke popkovnične krvi**

Popkovnično kri po odvzemu v porodnišnici shranjujejo v bankah popkovnične krvi. Banka PK je ustanova za celice in tkiva, ki zbira, obdeluje, shranjuje, dodeljuje in razdeljuje PK, namenjeno zdravljenju boleznis presajanjem.

V nekaterih bankah PK pred shranjevanjem obdelajo, odstranijo del eritrocitov in zmanjšajo volumen, drugod jih zaradi izgub med obdelavo shranjujejo neobdelane. Pred zamrzovanjem se PK doda krioprotektant DMSO, ki celice zaščiti pred poškodbo med zamrzovanjem, nato pa se celice zamrzne z nadzorovano hitrostjo in shrani v parah tekočega dušika pri temperaturi  $-150^{\circ}\text{C}$  oz. v tekočem dušiku pri temperaturi  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Glede na namen ločimo PK za alogensko in avtologno uporabo. PK za alogensko uporabo je alternativa kostnemu mozgu ali KMC iz periferne krvi zdravih odraslih darovalcev. V postopku nesorodne presaditve se PK pridobi iz javne banke PK na podlagi kriterijev tkivne skladnosti. Druga možnost so usmerjeni odvzemi ob rojstvu brata ali sestre za znanega bolnika, ki potrebuje presaditev KMC; v teh primerih je kar 25 % verjetnost popolne tkivne skladnosti. Popkovnično kri za alogenske namene shranjujejo v javnih bankah, za avtologne namene pa v zasebnih bankah PK. Prve financira javno zdravstvo, druge pa starši, ki kri shranijo.

### **Registri shranjenih enot PK**

Shranjevanje PK v javnih bankah poteka vzporedno z vzdrževanjem nacionalnih registrov odraslih tipiziranih darovalcev KMC. Nacionalni registri sicer ne shranjujejo biološkega materiala, temveč samo vodijo zbirke podatkov o prostovoljnih HLA-tipiziranih darovalcih, ki jih pokličejo, če se pokaže potreba po njihovih celicah. Omrežje registrov

shranjenih enot PK je sedaj razprostranjeno na vseh celinah in omogoča hiter dostop do primerne presadka (7, 8).

Evropsko združenje registrov PK je EUROCORD (<http://www.eurocord-ed.org/>). Po podatkih Eurocorda je bilo do konca leta 2011 v Evropi transplantiranih 5.892 enot PK, največ v Španiji, Italiji, Franciji in Nemčiji, od tega 54 % pri odraslih, največkrat kot dvojen enote. 70 % enot je bilo transplantiranih v Evropi, 30 % pa po načelih izmenjave med registri izven Evrope, predvsem v severni Ameriki. Drugo mednarodno združenje World Marrow Donor Association (WMDA) (<http://www.worldmarrow.org/>), ki zbira podatke iz 76 nacionalnih registrov darovalcev KMC in iz 139 bank PK, zato so statistični podatki te organizacije najbolj obširni in zanesljivi. Tretje združenje je Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) s sedežemv Leidnu (<http://www.bmdw.org/>), ki hrani podatke iz 64 registrov darovalcev KMC v 45 državah (nekatero države imajo več registrov) in o shranjenih enotah popkovnične krvi v 44 bankah PK v 26 državah. Po podatkih BMDW je bilo aprila 2013 skupno že 571.000 enot PK.

### **Shranjevanje avtologne PK**

Glede strokovne utemeljenosti shranjevanja avtologne PK v zasebnih bankah so različna strokovna združenja zadržana. Francija, Luksemburg in Italija zasebnih bank PK ne dovoljujejo. Mnenje Skupine za etiko v znanosti Evropske zveze (The European Union Group on Ethics, EGE) iz leta 2005 je, da za shranjevanje in uporabo avtologne PK trenutno ni dovolj indikacij; po drugi strani pa bodo v prihodnosti za različne presaditve lahko uporabljali tudi alogensko PK ali matične celice odraslih dajalcev (9).

Po drugi strani pa smo tudi priča hitremu razvoju regenerativne medicine, ki obljublja uporabo avtolognih MC za zdravljenje degenerativnih bolezni, zato zasebne banke upravičeno argumentirajo, da je neprimerno uničevati tako dragocena tkiva, kot so popkovnična kri, posteljica in njene sestavine. Zato so v zadnjem času nekateri strokovni avtorji in združenja shranjevanju avtologne PK bolj naklonjeni (10,11).

### **Zbiranje in shranjevanje PK v javni banki**

Javna banka PK v Sloveniji deluje kot Enota za shranjevanje popkovnične krvi (ESPOK) v okviru ZTM in zbira PK v sodelovanju z vsemi slovenskimi porodničnicami od aprila 2008. Cilj je zbrati 2000 enot PK in jih vpisati v register PK, kar bi pomenilo 10 shranjenih enot PK na 10.000 prebivalcev, kar je po oceni stroke dovolj glede na velikost in genetsko raznolikost slovenske populacije. Do konca leta 2012 smo zbrali 859 enot.

Od vseh odvzetih enot PK smo v zadnjih letih v shranjevanje uvrstili okrog 32 % enot, preostale enote pa smo zaradi premajhnega števila celic, prisotnosti mikroorganizmov ali prekoračitve časovnega intervala 48 ur od odvzema preventivno uničili. Pri tem je bil najpogostejši vzrok za premajhno število celic v enoti PK premajhen volumen odvzete PK (12). To pomeni, da okrog 70% enot popkovnične krvi, ki jo dajo starši v javno banko, ne bo nikoli uporabno.

## **Postopek darovanja PK v slovensko banko ESPOK**

Pred odvzemom PK se nosečnice prijavijo na ZTM, kjer dobijo potreben informacijski material in dodatne informacije o darovanju PK. Priporočamo, da se vse formalnosti opravijo pred 34. tednom nosečnosti. Ko izpolnijo prijavnico in medicinski vprašalnik ter podpišejo izjavo o poučenosti in privolitvev v odvzem PK, jih pregleda zdravnik in na podlagi meril za odvzem PK določi ustreznost za darovanje. Obvestilo o načrtovanem darovanju PK se pošlje v porodnišnico, enako obvestilo in paket z materialom za odvzem PK pa pošljemo še nosečnici. Na vsa vprašanja v zvezi s temi postopki se nosečnice lahko obrnejo na e-naslov [espok-ztm@ztm.si](mailto:espok-ztm@ztm.si) ali telefon 01 5438 305.

PK odvezamo v porodni sobi takoj po porodu in prerezu popkovnice, ko je posteljica še *in utero*, s punkcijo popkovnične vene ter zbiranjem PK v sterilno plastično vrečko, kjer se meša z antikoagulantom. Popkovnico najprej sterilno razkužimo tik nad prevezanim mestom in nato popkovnično veno punktiramo s transfuzijsko iglo. Popkovnico nato previdno »pomolzememo«, da preostala kri iz nje in iz posteljice steče v odvzemno vrečko. Zaporedno uporabimo obe igli, ki sta povezani na odvzemno vrečko. Odvzeti moramo vsaj 80 mL PK. Po odvzemu preostanek PK v cevki izperemo v odvzemno vrečko s pomočjo antikoagulantne raztopine v satelitni vrečki. Izpolnemo poročilo o odvzeti PK in odvzeto PK do transporta hranimo na sobni temperaturi.

Na ZTM najprej določimo volumen in število celic z jedrom in se na podlagi sprejetih standardov odločimo, ali je odvzeta PK primerna za shranjevanje ali jo namenimo za uničenje. V javno banko lahko sprejmemo PK z volumnom večjim od 50 mL in številom celic z jedrom (TNC) večjim kot  $0,90 \times 10^9$ . Po koncentriranju celic z jedrom jih zamrzemo in postavimo v karanteno. Ko dobimo končne izsledke testiranja kakovosti PK, sprostimo enoto iz karantene v trajno shranjevanje v tekočem dušiku za 15 ali celo 20 let.

Delovanje banke PK nadzoruje Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP). V skladu z našo zakonodajo morajo porodnišnice za to dejavnost pridobiti status donorskega centra.

## **Presaditve PK v Sloveniji**

V Sloveniji je bilo od leta 2004 opravljenih 6 presaditev KMC iz PK, ki smo jo pridobili iz tujih bank PK (Avstralija, Velika Britanija, Avstrija, Italija). Med bolniki je bilo pet otrok in en odrasel bolnik, ki so mu hkrati presadili 2 enoti PK. V treh primerih je bilo zdravljenje žal neuspešno, v enem primeru pa se matične celice iz PK prav tako niso prijele, naknadno pa je bila opravljena uspešna presaditev KMC odraslega darovalca.

## **Zaključek**

PK pomembno dopolnjuje vire KMC za presaditev v sklopu zdravljenja nekaterih bolezni otrok. Hkratna uporaba dveh PK omogoča uspešne presaditve tudi pri odraslih bolnikih. Glavna prednost presajanja PK je nizka stopnja bolezni presadka zoper gostitelja ob siceršnjem neskladju v sistemu HLA, medtem ko je zapozneno prijetje presadka zaradi omejenih celičnih odmerkov še vedno njena glavna slabost. Število potrebnih shranjenih enot PK za alogensko uporabo v Sloveniji ocenjujemo na največ 2000. Banke PK

pomagajo mednarodnim registrom tipiziranih dajalcev KMC, ker omogočajo širjenje možnosti alogenske presaditve, odpirajo pa se tudi možnosti uporabe MC v regenerativni medicini, za kar pa so bolj primerne avtologne celice iz PK, ki pa jih v Evropi praviloma shranjujejo zasebne banke PK.

## Literatura

1. Rožman P, Jež M: Matična celica in naprednozdravljenje napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo). Slovar. DCTIS–Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije 2010 April 20. Dosegljivo na: [http://www.dctis.org/terminoloski\\_koticek/slovar.pdf](http://www.dctis.org/terminoloski_koticek/slovar.pdf)
2. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174–1178.
3. Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol* 2010; 47: 3–12.
4. Sideri A, Neokleous N, De La Grange PB, Guerton B, Le Bousse Kerdilles M-C, Uzan G, Peste-Tsilimidos C, Gluckman E. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* 2011; 96 (8): 1213-1220.
5. Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *Br J Haematol* 2009; 147: 192–199.
6. Rubinstein P, Taylor PE, Scaradavou A, Adamson JW, Migliaccio G, Emanuel D, Berkowitz RL, Alvarez E, Stevens CE. Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells* 1994; 20: 587–596.
7. Garcia J. Allogeneic unrelated cord blood banking worldwide: an update. *Transfus Apher Sci* 2010; 42: 257–263.
8. Tonejc M. Registri kostnega mozga in registri popkovnične krvi doma in po svetu. *Zdrav Vestn* 2005; 74: 171-3.
9. The Uropean Group on Ethics in Science and new technologies to the European Commission. Opinión<sup>o</sup> 19–16/03/2004–Ethical aspects of umbilical cord blood banking. In: European Commission; 2005.
10. Hollands P, McCauley C. Private cord blood banking: current use and clinical future. *Stem Cell Rev* 2009; 5: 195–203.
11. Rožman P, Domanović D, Knežević M. Shranjevanje matičnih celic iz popkovnične krvi - danes in jutri. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 44-53.
12. Krašna M, Jazbec J, Černelč P, Domanovic D. Slovenska javna banka popkovnične krvi. *Farm vest* 2010; 61: 139–43.



**NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI  
V KARDIOLOGIJI**



## **Zdravljenju napredovalega srčnega popuščanja s krvotvornimi matičnimi celicami**

**dr. Gregor Poglajen, dr. med., prof. dr. Bojan Vrtovec, dr. med.**

Univezitetni klinični center, Ljubljana; Klinični oddelek za kardiologijo  
Program za napredovalo srčno popuščanje in transplantacije srca

### **Izveček**

Zaradi staranja populacije in učinkovitega zdravljenja akutnega miokardnega infarkta ter kroničnega srčnega popuščanja lahko v prihodnje pričakujemo porast bolnikov z napredovalim srčnim popuščanjem. Presaditev srca, sicer uveljavljena metoda zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja, je zaradi premajhne razpoložljivosti donorskih src in številnih kontraindikacij za poseg dostopna le manjšemu odstotku bolnikov. Presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC) predstavlja varno in glede na dosedanje podatke, relativno učinkovito alterantivo zdravljenju napredovalega srčnega popuščanja.

**Ključne besede:** *srčno popuščanje, matične celice*

### **Uvod**

Kljub velikemu napredku na področju medikamentoznega zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja njegova incidenca še vedno narašča. Presaditev srca danes predstavlja uveljavljeno metodo zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja, vendar je zaradi pomanjkanja donorskih src in zaradi številnih kontraindikacij za poseg dostopna le malemu številu bolnikov. V zadnjih letih so se zato začele uveljavljati nove metode zdravljenja srčnega popuščanja: resinhronizacijsko zdravljenje (CRT), terapija s krvotvornimi matičnimi celicami (KMC) in imunomodulatorno zdravljenje. Širše dostopna je postala tudi mehanska cirkulatorna podpora.

Številni živalske študije, pa tudi prve študije na ljudeh, so pokazali ugodne fiziološke in anatomske učinke presaditve avtolognih KMC tako pri zdravljenju akutnega miokardnega infarkta kot ishemične bolezni srca v dilatativni fazi (1-6). O učinkovitosti presaditve KMC pri zdravljenju dilatativne kardiomiopatije je v literaturi na voljo le malo podatkov. Naši izhodiščni podatki so vzpodbudni in kažejo, da naj bi bila presaditev KMC pri bolnikih z dilatativno kardiomiopatijo učinkovita metoda zdravljenja. Petletno sledenje bolnikov je pokazalo, da zdravljenje z matičnimi celicami izboljša tudi preživetje bolnikov z dilatativno kardiomiopatijo (7).

### **Izhodišča za zdravljenje s KMC**

Temelj zdravljenja z matičnimi celicami (kamor spadajo tudi KMC) predstavlja njihova sposobnost transdiferenciacije t.j. da v ustreznem citokinskem okolju preskočijo v novo celično linijo (8). Osnovni namen zdravljenja z matičnimi celicami naj bi tako bilo tvorjenje novih kardiomiocitov, ki bi nadomestili propadel miokard, in seveda njihova neovaskularizacija. Z živalskimi poskusi so ugotovili, da se matične celice, vbrizgane v obolel miokard, razvijejo v gladkomišične celice, endotelijske celice in kardiomiocite.

Slednji so se strukturno in funkcionalno vključili v okolni miokard. Pokazalo se je tudi, da ima na nativni miokard pomemben učinek tudi parakrino delovanje matičnih celic (9).

Kljub začetnim optimističnim napovedim so rezultati pri ljudeh precej skromnejši. Dokazali so sicer transdiferenciacijo KMC v endotelijske celice, ne pa tudi v kardiomiocite. Glede na novejšje podatke naj bi bilo pri ljudeh parakrino delovanje matičnih celic ključno za njihov terapevtski učinek.

Pomemben vidik zdravljenja z matičnimi celicami je tudi, da bolniku vsadimo njemu lastne celice, s čimer se izognemo doživljenjski imunosupresivni terapiji in njenim številnim, nemalokrat precej resnim, stranskim učinkom (oportunistične okužbe, maligna obolenja ipd.)

### **Indikacije in kontraindikacije za presaditev**

Za presaditev krvotvornih matičnih celic so primerni bolniki s srčnim popuščanjem, ki imajo:

- napredovalo srčno popuščanje, funkcijski razred NYHA III-IV,
- pogoste hospitalizacije zaradi dekompenzacije,
- 6-minutni test hoje manj kot 300 m,
- vsaj 3 mesece optimalno medikamentozno terapijo.

Glede na to, da še ne poznamo natančnega mehanizma delovanja KMC v miokardu, je zelo težko oceniti, katerim bolnikom bo ta oblika zdravljenja koristila in kateri nanjo ne bodo odgovorili. O jasno opredeljenih kontraindikacijah torej še ne moremo govoriti.

Izkušnje pa kažejo, da ima presaditev KMC največji učinek pri bolnikih z iztisnim deležem levega srčnega prekata med 20 in 35 %. V kostnem mozgu bolnikov z manjšim iztisnim deležem je zaradi napredovale bolezni manj matičnih celic, nižja pa naj bi bila tudi njihova viabilnost.

Edina do sedaj dobro opredeljena kontraindikacija za presaditev KMC je akutni miokardni infarkt (AMI) znotraj 7 dni pred presaditvijo. AMI imunološko namreč predstavlja močan vnetni signal, ki večino KMC preusmeri v diferenciacijo vzdolž bele celične linije.

### **Način presaditve**

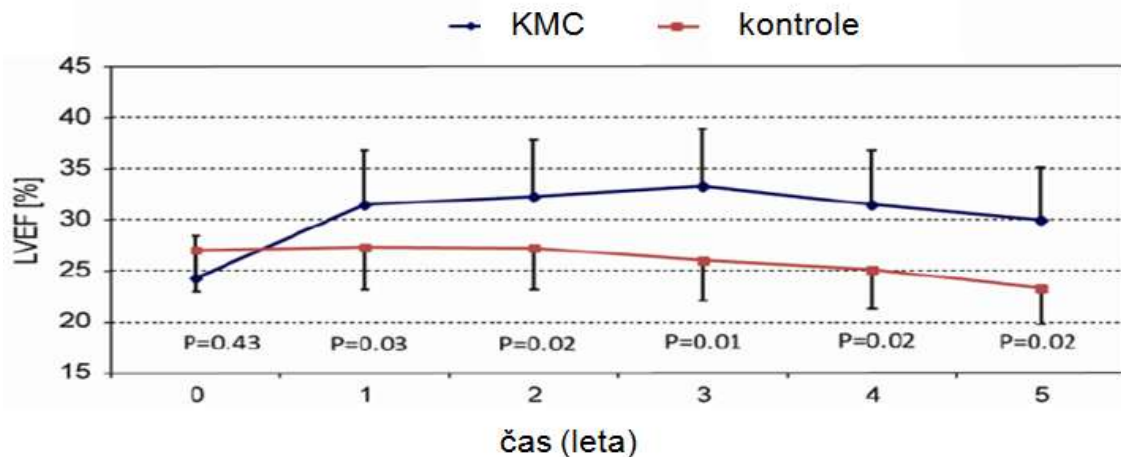
Na Kliničnem oddelku za kardiologijo UKC Ljubljana uporabljamo izključno CD 34+ matične celice, ki se nahajajo v kostnem mozgu. Bolnik najprej pet dni prejema G-CSF (granulocyte colony stimulating factor - Neupogen® ali Tevagrastim®), v odmerku 5-10 mcg/kg, s čimer dosežemo mobilizacijo zelenih celic iz kostnega mozga v kri. Ob tem redno kontroliramo nivo teh celic v periferni krvi in po potrebi stimulacijo s G-CSF podaljšamo. Peti dan opravimo zbiranje celic iz periferne krvi s celičnim separatorjem. Iz dobljenega ekstrakta celic nato zelene CD 34 + celice izberemo z metodo imunomagnetne pozitivne selekcije. Sama aplikacija KMC poteka v katetrskem laboratoriju, poseg pa je na prvi pogled enak koronarografiji.

V živalskih poskusih je opisano več načinov presajanja matičnih celic: transepikardno ali transendokardno injiciranje, enostavno vbrizgavanje v votlino levega prekata in intrakoronarna aplikacija. Pri ljudeh se v glavnem uporabljata transendokardni in intrakoronarni način aplikacije celic. V prvih letih (od maja 2006 do septembra 2010) smo na KO za kardiologijo, UKC Ljubljana uporabljali intrakoronarno aplikacijo. Od leta 2010 dalje pa matične celice implantiramo v srčno mišico transendokardialno s sistemom NOGA. Tako dosežemo tudi do 8-krat večjo retenco celic v tarčnem miokardu.

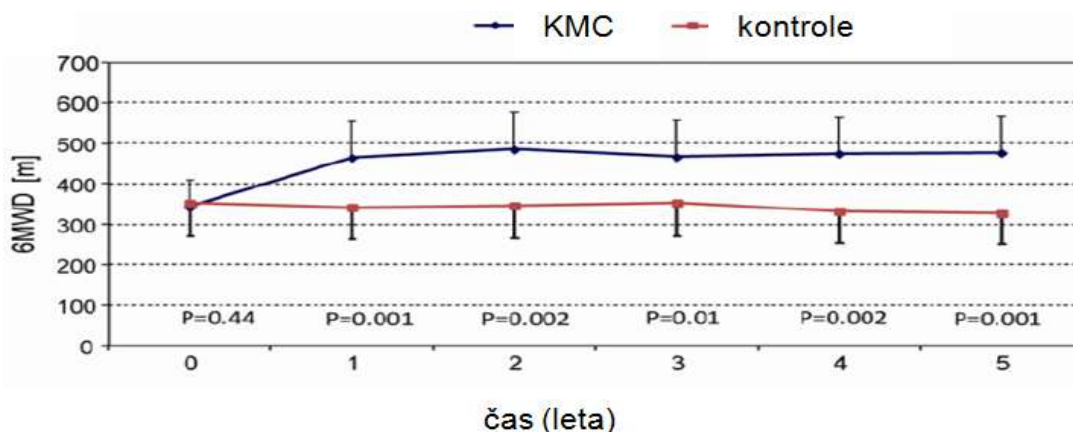
## Rezultati

Način zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja s presaditvijo matičnih celic je nova metoda in obsežnih multicentričnih randomiziranih študij na tem področju še ni. Glede na podatke, ki so na voljo, je presaditev matičnih celic varna in relativno enostavna metoda, ki je najučinkovitejša pri ljudeh z iztisnim deležem levega srčnega prekata med 20 in 35 % in z neishemično etiologijo srčnega popuščanja. Po danes dostopnih podatkih so CD34+ tista skupina matičnih celic, ki imajo največjo "kardioregenerativni" potencial in dajejo najboljše rezultate. V zadnjem času pa intenzivno raziskujejo tudi potencial mezenhimskih stromalnih celic in pa in-vitro predhodno obdelanih celic. Rezultate o učinkovitosti teh še čakamo.

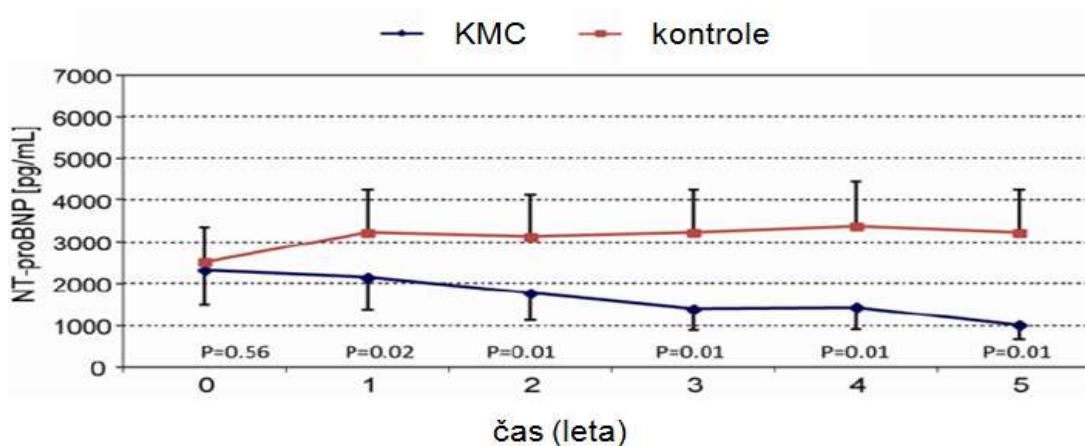
Na Kliničnem oddelku za kardiologijo UKC Ljubljana smo z matičnimi celicami do sedaj zdravili okrog 140 bolnikov. Naši rezultati kažejo, da terapija z matičnimi celicami pri bolnikih, ki že jemljejo optimalno terapijo za srčno popuščanje, izboljša funkcijo levega prekata (Graf 1), bolnikovo telesno zmogljivost (Graf 2) in zmanjša neurohumoralno prevzdraženost (Graf 3). Zdravljenje z matičnimi celicami izboljša 5-letno preživetje bolnikov (Graf 4).



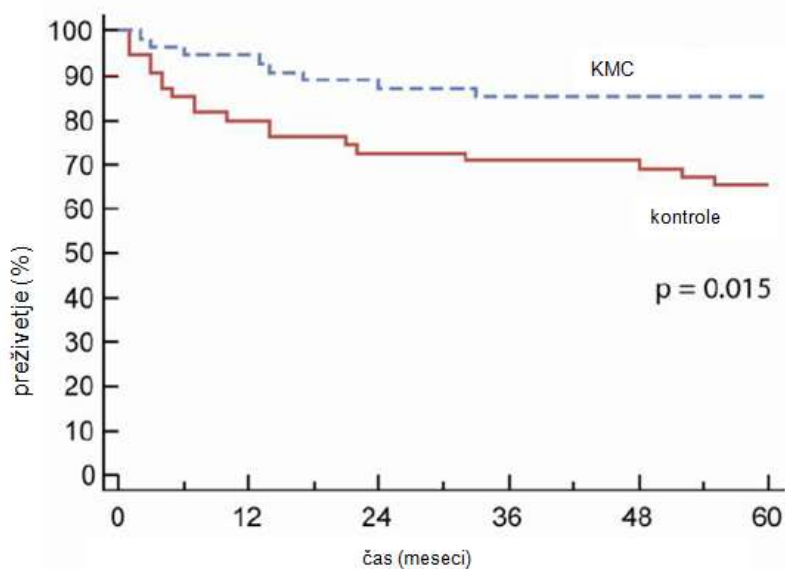
Graf 1: Izboljšanje iztisnega deleža levega srčnega prekata (LVEF) pri bolnikih po zdravljenju z matičnimi celicami.



Graf 2: Izboljšanje 6 minutnega testa hoje (6MWD) pri bolnikih po zdravljenju z matičnimi celicami.



Graf 3: Izboljšanje nevrohumoralne prevzdraženosti (NT-proBNP) pri bolnikih po zdravljenju z matičnimi celicami



Graf 4: Izboljšano 5-letno preživetje pri bolnikih zdravljenih z matičnimi celicami

## Zapleti

Stimulacija z G-CSF in zbiranje KMC sta pri vseh bolnikih potekala brez zapletov. Ravno tako resnejših zapletov nismo imeli pri intrakoronarni ali transendokardni aplikaciji zbranih celic. Smrti, ki bi bile neposredno povezane s presaditvijo s KMC nismo zabeležili.

## Zaključek

Presaditev KMC predstavlja varno in glede na dosedanje podatke, učinkovito alterantivo zdravljenju napredovalega srčnega popuščanja, ki je dostopna precej širšemu krogu bolnikov. Kljub temu bo v prihodnje potrebno odgovoriti še na vprašanja kot so: katera vrsta matičnih celic je najprimernejša, kdaj je najprimernejši čas za njihovo implantacijo, katera metoda implantacije je najučinkovitejša, kolikšno število matičnih celic je potrebno za učinkovito zdravljenje. Zaradi izjemno hitrega razvoja področja lahko pričakujemo, da bo na večino vprašanj možno odgovoriti v nekaj letih, kar bo dodatno pripomoglo k terapevtski učinkovitosti zdravljenja srčnega popuščanja z matičnimi celicami.

## Literatura

1. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2002; 91:1092-102.
2. Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* 2002; 92:288-96.
3. Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(6 Suppl):S20-
4. [Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM.](#) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2002; 106(24):3009-17.
5. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003; 107:2294-302.
6. [Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, Seifried E, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM; TOPCARE-CHD Registry.](#) Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007; 100(8):1234-41.
7. Bojan Vrtovec, Matjaz Sever, Luka Lezaic, Dragoslav Domanovic, Gregor Poglajen, Jurij Fettich, Peter Cernelc, Branislav Radovancevic, Guillermo Torre-Amione. Autologous Intracoronary Stem Cell Transplantation Improves Cardiac Function and Exercise Capacity In Patients with End-Stage Dilative Cardiomyopathy. *Circulation.* 2007; 116:II\_398.
8. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002; 91:189-201.
9. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 996:152-7.

## Odvzem krvotvornih matičnih celic pri kardiološkem bolniku

**Andreja Nunar Perko, dipl.m.s.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana; Oddelek za preskrbo s krvjo  
andreja.nunar@gmail.com

### Izvleček

Zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic je v zadnjih desetih letih bistveno izboljšalo potek številnih malignih in nemalignih bolezni krvi in krvotvornih organov. Vse bolj se uporablja tudi za zdravljenje nekaterih drugih bolezni. Z uporabo dejavnikov, ki pospešujejo nastanek in dozorevanje krvotvornih matičnih celic se lahko s pomočjo celičnih ločevalcev, s postopkom citaferenze, zbere zadostna količina celic iz periferne venske krvi, ki je potrebna za presaditev. To je zahteven postopek, ki zahteva koordinirano sodelovanje multidisciplinarne skupine strokovnjakov. Medicinske sestre izvajajo vse postopke od priprave dajalca in celičnega ločevalca, vzpostavitve žilnih pristopov do nadzora nad delovanjem celičnega ločevalca. Izvajajo vse potrebne intervencije zdravstvene nege pri dajalcu.

**Ključne besede:** *bolnik, krvotvorne matične celice, presaditev*

### Uvod

Razvoj presajanja krvotvornih matičnih celic (KMC) je tesno povezan z odkritjem antigenov tkivne skladnosti in razvojem zdravljenja s citostatiki, imunosupresivnimi zdravili, antibiotiki in antimikotiki ter z napredkom obsevalne tehnike. Presajanje KMC je zahteven postopek, ki zahteva koordinirano sodelovanje multidisciplinarne skupine strokovnjakov. Z uvajanjem novih strategij in postopkov se indikacije za zdravljenje s presajanjem KMC nenehno spreminjajo in širijo. Spoznanja in izkušnje, pridobljene s presajanjem KMC, so sprožile raziskovanje matičnih celic in prispevale h graditvi temeljev zdravljenja bolezni, ki se imenuje zdravljenje s celicami in tkivi ali celična terapija (1).

KMC za presajanje dobimo lahko iz kostnega mozga, periferne venske krvi in iz popkovnične krvi (PK) (2). Najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na uspešnost presaditve KMC sta število presajenih celic CD34+ in skladnost tkivnih antigenov HLA med darovalcem in prejemnikom celic (3).

Strokovnjaki Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra in Zavoda RS za transfuzijsko medicino (ZTM) v Ljubljani so naredili prvi odvzem kostnega mozga pri bolniku 27.12.1988. V januarju leta 1989 pa je bila nato izvedena prva avtologna presaditev kostnega mozga. Prvi odvzem KMC s celičnim ločevalcem je bil izveden na ZTM 15. 5. 1989. Presaditve KMC so v Sloveniji pričeli rutinsko izvajati leta 1989 (1).

Leta 1995 so za sorodno alogensko presaditev prvič dali darovalki KMC krvotvorne citokine, ki spodbujajo tvorbo granulocitnih kolonij (granulocyte colony stimulating factor - G-CSF) Leta 1997 so opravili prvo avtologno presaditev KMC pri bolnicah s karcinomom dojke in leta 2000 tudi z malignimi limfomi (4).

10.5.2006 so v Kliničnem centru v Ljubljani začeli izvajati presaditve avtolognih KMC pri bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem neishemičnega vzroka, ki so bili uvrščeni na listo čakajočih za presaditev srca (5). V obdobju od 2006 do aprila 2013 je bilo uspešno opravljenih 137 odvzemov avtolognih KMC.

### **Krvotvorne matične celice**

KMC so primitivne pluripotentne celice s sposobnostjo samoobnovitve in diferenciacije v vse vrste krvnih celic. Nahajajo se v kostnem mozgu, kjer jih pri zdravih osebah in bolnikih v remisiji bolezni najdemo od 0,5 do 3%. V manjšem številu pa krožijo tudi v periferni krvi, kjer jih najdemo od 0,01 do 0,1%. Velikost in specifična teža KMC je podobna mononuklearnim celicam polne krvi. Matične celice se prepozna po njihovi sposobnosti tvorbe kolonij in po specifičnih površinskih membranskih označevalcih. Za KMC je značilen membranski označevalec CD34, ki ga določajo z monoklonskim protitelesom (6).

Za zagotavljanje uspešnosti zbiranja KMC za presaditev je potrebno zadostno število CD34+ celic v periferni venski krvi. Zato za zadostno količino KMC v periferni krvi vzpodbujajo kostni mozeg s citostatiki, krvotvorni citokini, kombinacijo citostatikov in krvotvornih citokinov in antagonisti adhezijskih molekul (7). Običajno se pri kardioloških bolnikih uporablja rastne dejavnike, ki spodbuja tvorbo granulocitnih kolonij v gojišču (Neupogen®). Filigrastin se daje bolnikom v obliki podkožnih injekcij. Dnevni odmerek je 10 µg/kg telesne mase. Postopek je relativno varen z blagimi neželenimi pojavi kot so bolečine v kosteh, glavobol, utrujenost, slabost. Življenjsko ogrožujoči zapleti so izredno redki (8).

Število KMC v periferni krvi začnejo spremljati peti dan od začetka dajanja rastnega faktorja, oziroma, ko je število levkocitov več kot  $3.0 \times 10^9/L$ . S citaferezo se prične ko je v periferni krvi vsaj  $20 \times 10^6/L$  CD34+celic. Za uspešno presaditev je potrebno zbrati vsaj  $2 - 5 \times 10^6$  CD34  $10^6$  pozitivnih celic na kilogram telesne teže prejemnika, pri kardioloških bolnikih pa več kot  $200 \times 10^6$  (9).

Avtologne in alogenične KMC se lahko zbirajo s punkcijo kostnega mozga iz ploščatih kosti, s postopkom citafereze iz periferne venske krvi in s punkcijo popkovnične vene iz placentne krvi. Pripravki KMC so namenjeni zagotavljanju uspešnosti presaditve, ko se vse vrste krvnih celic v prejemnikovi krvi dvignejo na normalno raven in normalno delujejo (10).

### **Načini presajanja krvotvornih matičnih celic**

#### ***Alogenična sorodna PKMC***

- Presajene KMC so od sorodne tkivno skladne osebe. Najprimernejši darovalec je bolnikov brat ali sestra, ki se z njim ujema v podedovanih lastnostih, imenovanih antigeni HLA (humani limfocitni antigeni). Žal je taka skladnost možna le v 25% primerov (11).

### ***Alogenična nesorodna PKMC***

- Presajene KMC so od nesorodne tkivno skladne osebe. Če bolnik nima sorodnega HLA tkivno skladnega darovalca, ali zaradi narave bolezni avtologna PKMC ni možna, se odločijo za presaditev nesorodnega tkivno skladnega darovalca, ki se poišče v mednarodnih registrih prostovoljnih darovalcev kostnega mozga (11).

### ***Avtologna PKMC***

- Presajene KMC so prejemnikove. Bolniku v določenem obdobju zdravljenja, odvzamejo njegove lastne KMC, jih nato zamrznejo in shranijo in s tem obvarujejo pred škodljivimi učinki radioterapije in kemoterapije. Po predhodni pripravi bolnika s kemoradioterapijo pride nato do presaditve teh celic (11). Avtologna presaditev KMC se uporablja pri zdravljenju bolnikov z napredovalim srčnim popuščanjem.

## **Celični ločevalci**

Odvzem KMC iz venske krvi izvajamo s celičnimi ločevalci. To so pretočni ločevalci, ki ločujejo polno kri v posamezne sestavine. Pri vseh ločevalcih je zbiranje avtomatsko in računalniško vodeno. Računalnik spremlja postopek ločevanja in v primeru nepravilnosti samodejno prekine postopek. S tem je poskrbljeno za dodatno bolnikovo varnost. Potek zbiranja spremljamo na kontrolnem zaslonu. Ločevalci so programirani za zbiranje različnih krvnih celic. Tako lahko zbiramo trombocite, granulocite, KMC, limfocite in plazmo.

Pred postopkom zbiranja vnesemo v računalnik ločevalca podatke, na podlagi katerih bo potekalo zbiranje. Na podlagi višine in teže bolnika izračunamo bolnikov krvni volumen, glede na število bolnikovih levkocitov določimo, kolikšna bo količina krvi predelane v enem ciklusu zbiranja, in koliko ciklusov bomo naredili (12). Za eno zbiranje upošteva en, do dva kratni bolnikov krvni volumen. Ena citafereza traja v povprečju tri do štiri ure.

Pri citaferezi se sestavine krvi ločujejo s pomočjo centrifugiranja po načelu različne specifične gostote in velikosti delcev. Bolnika priključimo na ločevalec in kri, pomešana z antikoagulantom s pomočjo črpalke teče v zbiralno vrečko, ki je nameščena v centrifugi. V vrečki se zaradi centrifugiranja in določene specifične gostote kopičijo KMC, vse ostale sestavine pa se bolniku vračajo nazaj. Po koncu vsakega ciklusa zbiranja ločevalec zbrane KMC pretoči v posebno vrečko. Na en ciklus se zbere približno 10 ml krvi, v kateri so KMC. Med postopkom zberemo od 100 do 200 ml plazme, ki jo uporabimo pri zamrzovanju KMC ali pa jo dodamo v pripravek (12).

## **Odvzem KMC kardiološkim bolnikom na Kliničnem oddelku za kardiologijo**

Pred zbiranjem je potrebno posredovati bolniku vse informacije povezane s postopki zbiranja, predelave, shranjevanja in presajanja KMC, ter pridobiti njegovo pisno privolitev. Za mladoletnega dajalca izjavo in soglasje potrdi njegov zakoniti zastopnik (10).

### ***Postopki pred odvzemom KMC***

Pri kardioloških bolnikih se odvzem KMC iz venske krvi izvaja na KO za kardiologijo. Zaradi bolezenskega stanja se pri bolnikih ves čas postopka nadzorujejo življenjske funkcije (monitor). Medicinske sestre iz ZTM, iz Odseka za zbiranje in shranjevanje KMC,

bolnika prehodno obiščemo na oddelku. Dodatno ga seznanimo s postopkom, pregledamo vene na rokah in se v primeru neustreznih ven na rokah dogovorimo za centralni venski kateter.

Medicinske sestre na oddelku opozorimo, da vene v komolčnem predelu ne uporabljajo za odvzem krvnih vzorcev in terapijo. Poleg dobre telesne in duševne pripravljenosti bolnika je eden od pogojev, ki zagotavljajo uspešen odvzem KMC, tudi ustreznost bolnikovih ven na rokah. Ker je pri odvzemu potrebno zagotoviti pretok krvi 40-80 ml/min, uporabljamo za venepunkcijo igle premera 17G. Vene morajo biti vidne ali otipljive, dobrega tonusa, gibljive in primerne velikosti (13).

Pred odvzemom se pri bolniku opravijo tudi testi za zagotavljanje kakovosti v pripravku KMC: krvna skupina ABO in RhD, anti HIV I/II, HbsAg, anti HCV, anti HBc, anti Sifilis, hemogram, število enojedrnih celic in krvotvornih matičnih celic (CD34+celic) (10).

Z bolnikovimi podatki izpolnimo List za citaferezo in List krvodajalca. Bolnike računalniško vodimo kot krvodajalce.

Ob bolniku je ves čas postopka prisotna medicinska sestra, ki izvaja postopek zbiranja in bolniku zagotavlja zdravstveno nego v času odvzema. Namen zdravstvene nege je pomagati bolniku pri življenjskih aktivnostih, kjer se lahko pojavijo problemi ali pa je zadovoljevanje le teh potrebno posebej obravnavati.

Medicinske sestre pripravimo celični ločevalec in ves ustrezen material za transport na KO za kardiologijo. Center za logistiko na ZTM organizira ustrezno prevozno sredstvo za prevoz celičnega ločevalca.

### ***Odvzem KMC***

Bolnika na odvzem KMC pripravijo že medicinske sestre na oddelku (prehrana, obleka, opravljanje fizioloških potreb). Pazimo predvsem na udoben in primeren položaj rok, ki omogoča dober žilni pristop. Pomembno je, da se bolnik sprost, psihično umiri in udobno namesti v posteljo. Za venepunkcijo so najprimernejše vene v komolčni jami. Punkcijsko mesto očistimo z dezinfekcijskim sredstvom in izvedemo venepunkcijo na obeh rokah. V primeru odvzema KMC s centralnim venskim katetrom ustrezno oskrbimo kateter. Če je potrebno, odvezamo še dodatne vzorce krvi za laboratorijske preiskave. Preverimo pretok obeh venskih kanil in pričnemo s citaferezo (14).

Medicinska sestra izvaja celotno zdravstveno nego bolnika pred, med in po odvzemu, nadzoruje tudi delovanje ločevalca. Vsa sporočila celičnega ločevalca in vse posege pri bolniku beležimo v List za citaferezo. Pomembna je pazljivost in natančnost pri označevanju odvzetih vzorcev krvi in vreče s pripravkom KMC.

Pri postopku odvzema KMC lahko pride do zapletov pri bolniku in pri delovanju ločevalca. Osebje, ki sodeluje pri odvzemu, mora biti usposobljeno, da ob takih zapletih pravilno ukrepa.

Pojavijo se lahko napake v setu za odvzem KMC (počena ali neprehodna cevka). Pred pripravo celičnega ločevalca set pregledamo. Če so na setu vidne napake, ga zavržemo. Ko set namestimo na ločevalec, hkrati preverimo njegovo delovanje in ustreznost.

Med postopkom odvzema KMC lahko pride do prekinitve električne napetosti. Pred odvzemom mora medicinska sestra preveriti, ali je ločevalec priključen na pravo vtičnico, ki omogoča delovanje tudi v primeru prekinitve električne napetosti. V primeru okvare celičnega ločevalca postopek odvzema KMC prekinemo (14).

### ***Zaključek odvzema KMC***

Ob zaključku odvzema se pri bolniku ponovno odvzamejo vzorci krvi za hemogram, določanje števila enojedrnih celic in števila CD34+ celic (10).

Ko je postopek odvzema KMC končan, sterilno oskrbimo punkcijski mesti in jih povijemo. Punkcijsko mesto naj bo povito s povojem vsaj dve uri po odvzemu. Če smo naredili odvzem preko centralnih venskih katetrov jih ustrezno oskrbimo in sterilno prekrijemo. Bolniku povemo, kako naj ravna s punkcijskim mestom. Medicinske sestre na oddelku obvestimo o stanju bolnika po odvzemu.

Preverimo oznake na vrečki s pripravkom KMC, vzorce krvi in s podatki dopolnimo bolnikovo dokumentacijo. Pripravek KMC odnesemo v transportni torbi na ZTM. Shranjuje se na  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , da naslednjega dne (14).

### ***Zapleti, neželene reakcije pri bolniku***

- *pred odvzemom*

Težave povzročajo vene, ki so pri bolnikih lahko zelo prizadete. Venepunkcija pri takem bolniku zahteva od medicinske sestre še dodatno zbranost in natančnost, saj je od uspešnosti venepunkcije odvisen nadaljnji potek odvzema KMC. Pomembno je, da je bolnika seznanimo z možno bolečino ob venepunkciji. Ljudje so različno občutljivi in imajo različen prag bolečine, zato tudi bolečino ob venepunkciji različno sprejemajo. Pri venepunkciji pride lahko do različnih zapletov (hematom, bolečina - vzdraženost živca, poškodba živca, poškodba kite, bolečina v roki, punkcija arterije, lokalna alergija, zračna embolija) (15).

Pri odvzemu KMC preko centralnega venskega katetra je lahko zmanjšan pretok krvi zaradi neprehodnega katetra (fibrinske obloge v katetru)(16).

- *med odvzemom*

Med postopkom odvzema KMC lahko bolnik zaradi nehotenega giba z roko poškoduje veno. Zato bolnika že pred postopkom opozorimo, da naj za vsak gib ali premik, ki ga želi narediti z roko, pove medicinski sestri. V primeru hematoma ustavimo postopek zbiranja KMC, oskrbimo mesto hematoma in ponovimo postopek venepunkcije na drugi veni. Ves čas postopka medicinska sestra nadzoruje mesti venepunkcije in pretok krvi. Ne zadosten pretok krvi je lahko posledica slabše prehodnega katetra.

Pri odvzemu uporabljeni antikoagulant lahko povzroči hipokalcemijo, ki je rezultat vezave kalcija na citrat. Reakcija se pri bolniku izraža z odrevenelostjo in mravljinici v udih in z mravljinici okoli ust. V težjih primerih pa se pojavijo krči v udih in bolečina za prsnico. Postopek odvzema ustavimo ali upočasnimo hitrost pretoka krvi. Znaki hipokalcemije hitro izginejo, če bolniku damo kalcij (tableta ali injekcija). Pri bolnikih je treba paziti, da ne pride do volumske preobremenitve (17).

Pri bolniku se lahko pojavijo klinični znaki zmanjšane krvnega volumna: znižan krvni tlak, tahikardija, pojavi se potenje, vrtoglavica, omotičnost in krči. V teh primerih postopek prekinemo. Volumen krvi nadomeščamo s fiziološko raztopino toliko časa, da se stanje bolnika umiri. Odvzem nadaljujemo s počasnejšim pretokom krvi. Zato je pomembno, da bolnika skrbno opazujemo ves čas postopka.

Vazovagalna reakcija je kratkotrajna nezavest zaradi hipoksije osrednjega živčnega sistema, ki nastane zaradi nenadnega slabšega pretoka krvi skozi možgane. Gre za kratkotrajen, nagel padec krvnega tlaka. Povod za te reakcije je pri občutljivih osebah najpogosteje strah, pogled na kri, bolečine povezane s punkcijo, slabo psihofizično počutje, slab zrak v prostoru, lakota. Zato je pomembna priprava bolnika na odvzem. Kolaps lahko poteka po intenzivnosti v treh stopnjah (nemir, hitrejše dihanje, padec krvnega tlaka, bledica, znojenje, nadaljuje se lahko z izgubo zavesti, slabo tipljiv pulz, inkontinenca, do nehotenih gibov in globoke nezavesti) (17). Medicinska sestra mora poznati znake začetka reakcije in takoj ustrezno ukrepati (prekinitev postopka, vzdrževanje prehodnosti venskih poti s fiziološko raztopino, pravilen položaj bolnika, kar nam omogočajo že stoli za odvzem, proste dihalne poti, čist in svež zrak, hladna pijača).

- *po odvzemu*

Predvsem pri hematoloških in onkoloških bolnikih lahko po odvzemu pride do trombocitopenija. Zato je potrebna kontrola števila trombocitov pred in po odvzemu KMC. Po odvzemu se lahko pojavi tudi hematoma, flebitis, tromboza.

### ***Priprava KMC za presaditev***

Dan po odvzemu KMC se pripravek še dodatno obdela. Z napravo CliniMACS, ki deluje na osnovi imunomagnetnega ločevanja, se celice predhodno označijo z mišjimi protitelesi. Celice se nato povežejo s protitelesi, ki so označena s supramagnetnimi železo-dekstranovimi nanodelci. Višek nevezanih protiteles se odstrani s centrifugiranjem. Postopek izolacije poteka v sistemu vrečk za enkratno uporabo. Tako se pripravek očisti preostalih celic, ki niso potrebne za presaditev. Z dodatnim centrifugiranjem je končna količina produkta 8 ml. Produkt je steril in vsebuje vsaj 50% celic CD34+, ki se nahajajo v začetnem celičnem pripravku. Postopek obdelave traja 6 ur. Oddamo ga na KO za nuklearno medicino, kjer ga označijo z radioaktivnim izotopom (18).

### **Zaključek**

Z uvajanjem novih postopkov se indikacije za zdravljenje s presajanjem KMC spreminjajo in širijo tudi na področju kardiologije. Odvzemi KMC s postopkom afereze so varni in učinkoviti postopki tudi pri bolnikih z napredovalim srčnim popuščanjem. Medicinske sestre sodelujemo pri vseh postopkih, od priprave bolnika do izvedbe postopka.

### **Literatura**

1. Domanović D. Zgodovina presajanja krvotvornih matičnih celic v Sloveniji in v svetu. V: Nunar Perko A, Gregorc C, ur. Pridobivanje krvotvornih matičnih celic - zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC: zbornik predavanj. Zreče 25.-26. maj. 2007. Ljubljana: Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007: 15 - 21.

2. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Grathwohl A, Masszi T. Haematopoietic Stem Cell transplantation. The EBMT Handbook. 5th rev. edition. European School Of Haematology. Genoa: Forum service editore, 2008:112-125.
3. Krašna M, Jazbec J, Černelč P, Domanović D. Slovenska javna banka popkovnične krvi. Farm vest 2010; 61 (3): 139 - 144.
4. Pretnar J. Petnajst let presajanja krvotvornih matičnih celic v Sloveniji. Zdrav vest 2004:73 (S D): 4.
5. Stanišič S. Zbiranje perifernih krvotvornih matičnih celic pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem. V: Knjiga povzetkov. 4. kongres hematologov in transfuziologov Slovenije z mednarodno udeležbo. Podčetrtek 12.- 14. April 2012. Ljubljana: Združenje hematologov Slovenije, 2012: 109.
6. Pretnar J. Krvotvorne matične celice – pridobivanje, uporaba in posebnosti bolnikov po presaditvi. V: Nunar Perko A, Gregorc C, ur. Pridobivanje krvotvornih matičnih celic-zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC: zbornik predavanj. Zreče 25.-26. maj. 2007. Ljubljana: Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007: 22 - 25.
7. Domanović D. Presajanje krvotvornih matičnih celic. <http://www.ztm.si/res/doc/PRESAJANJE%20Domanovic-3250.pdf> <20. 5. 2012>.
8. Sever M, Černelč P, Vrtovec B, Ležaič L, Fettich J, Domanović D. Presaditev avtolognih krvotvornih matičnih celic v srce bolnikov z napredovalim srčnim popuščanjem. V: Nunar Perko A, Gregorc C, ur. Pridobivanje krvotvornih matičnih celic-zdravljenje in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi KMC: zbornik predavanj. Zreče 25.-26. maj. 2007. Ljubljana: Sekcija medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji, 2007: 44 – 46.
9. Domanović. D. Pomen želatinaze B (metaloproteinaze – 9) za zbiranje krvotvornih matičnih celic. [doktorska disertacija]. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2006.
10. Pravilnik o darovanju in pridobivanju človeških tkiv in celic. Uradni list Republike Slovenije št. 70/2008, 11.7.2008.
11. Pretnar J. Presaditev krvotvornih matičnih celic. V: 24. strokovni sestanek hematološkega društva laboratorijskih tehnikov: zbornik predavanj. Rogaška Slatina 21.-22. oktober 2011. Ljubljana: Hematološko društvo laboratorijskih tehnikov, 2011: 14 - 16.  
Mononuclear cell collection procedure. Operator's manual. Fenwal Amicus Separator. Baxter Healthcare Corporation, 2001.
12. Nunar Perko A. Odvzem in infuzija krvotvornih matičnih celic. V: 24. strokovni sestanek hematološkega društva laboratorijskih tehnikov: zbornik predavanj. Rogaška Slatina 21.-22. oktober 2011. Ljubljana: Hematološko društvo laboratorijskih tehnikov, 2011: 19 - 21.
13. Odvzem krvotvornih matičnih celic iz venske krvi s celičnim ločevalcem. Standardni operativni postopek. SOP-P.M-11. Zavod R Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2013.
14. WHO guidelines on drawing blood: best practice in phlebotomy. Geneva, World health Organization, 2010: 25-29.
15. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599221\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599221_eng.pdf) <20.7.2012>
16. Šmitek J., Kirst A, Gaspari L. Osrednji venski katetri. V: Šmitek J, Krist A, ur. Venski pristopi, odvzemi krvi in dajanje zdravil. Ljubljana: Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2008: 78-91.
17. Crookston K, Simon T. Physiology of Apheresis. In: McLeod BC, Price TH, Weinstein R, eds. Apheresis: Principles and Practice, 2nd Edition. Bethesda, MD: AABB Press, 2003: 71-93.
18. CliniMACS User Manual US Edition. Miltenyi Biotec GmbH, Germany. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM272481.pdf> <28.4.2013>

## **Presaditev krvotvornih matičnih celic kardiološkemu bolniku z vidika medicinske sestre**

**Sabina Ocepek, dipl. m. s.**

Univerzitetni klinični center, Ljubljana; Klinični oddelek za kardiologijo  
sabina.ocepek1@gmail.com

### **Izvleček**

Presaditev krvotvornih matičnih celic kardiološkemu bolniku pomeni novo metodo zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja. Prispevek obravnava vidik medicinske sestre ter njeno vlogo v času pred in po presaditvi. Opisani so postopki zdravstvene nege od sprejema bolnika do njegovega odpusta. Medicinska sestra upošteva načelo celostne in individualne obravnave bolnika ter potrebna specialna znanja s področja zdravstvene nege bolnika s srčnim popuščanjem.

**Ključne besede:** *krvotvorne matične celice, presaditev, medicinska sestra, zdravstvena nega*

### **Uvod**

Presaditev krvotvornih matičnih celic kot sodobna metoda zdravljenja predstavlja velik napredek na področju kardiologije. Gre za invazivni poseg, katerega izvajalec je interventni kardiolog skupaj z ostalimi člani tima. Presaditev se vrši v kateterskem laboratoriju pod rentgenskim nadzorom. Začetki segajo v leto 2006, ko sta bila na ta način uspešno zdravljeni dva bolnika. Do danes smo opravili 128 presaditev krvotvornih matičnih celic tako intrakoronarno, kot tudi intramiokardno. Kar pomeni v povprečju štiri bolnike mesečno. Prednost zdravljenja s krvotvornimi matičnimi celicami (v nadaljevanju KMC) je predvsem v tem, da bolniku transplantiramo njegove lastne celice. Na ta način se izognemo imunosupresivni terapiji in komplikacijam, ki so lahko z njo povezane. Uporabljamo KMC periferne krvi imenovane CD34+ (Poglajen in Vrtovec 2010).

Krvotvorne ali hemopoetske matične celice so celice, ki imajo izredno visoko sposobnost samoobnove, diferenciacije in plastičnosti. Nahajajo se v kostnem mozgu in se jih lahko odvzame na različne načine. Osnovni namen zdravljenja s KMC naj bi tako bilo tvorjenje novih srčno mišičnih celic, ki bi nadomestile propadel miokard, in seveda tvorjenje novega kapilarnega sistema v prizadetem delu srčne mišice (Vrtovec, 2008).

### **Priprava bolnika na presaditev KMC**

Bolnik pri katerem se odločimo za zdravljenje s KMC, zahteva profesionalno obravnavo širšega kroga zdravstvenega osebja. Timsko delo je pri tovrstnem zdravljenju napredovalega srčnega popuščanja nujno potrebno za doseg skupnega cilja t.j. izboljšanje zdravja in s tem kakovosti življenja bolnika. Bolnika moramo videti takšnega kot je, in ne takšnega, kot bi si mi želeli, da je. S svojim strokovnim znanjem mu skušamo razbliniti strahove in razjasniti dileme. Razložimo mu potek njegove bolezni. Seznanimo ga s postopki in posegi, ki mu jih bomo naredili, kakšne so prednosti in morebitna tveganja. Za

tovrstno delo moramo biti ustrezno strokovno izobraženi in usposobljeni. V času hospitalizacije s tem pridobimo bolnikovo zaupanje. Njegova pripravljenost aktivnega sodelovanja se poveča, motiviranost za spremembo načina življenja je poudarjena.

Zavedati se moramo, da smo medicinske sestre tiste, ki smo ves čas ob bolniku in opazimo vsako najmanjšo spremembo zdravstvenega stanja. Naša opažanja in pravilno ukrepanje velikokrat pripomorejo k pravočasnemu zdravljenju.

Bolnik je na oddelek sprejet en teden pred predvideno presaditvijo KMC. Ob sprejemu mu odvzamemo kri za osnovne laboratorijske preiskave. Posnamemo mu običajen 12 kanalni in visokoločljivostni EKG. Bolnik opravi ultrazvok in scintigrafijo srca in PET CT. Zmerimo mu endotelijsko disfunkcijo. Opravi šest minutni test hoje.

Pet dni pred presaditvijo KMC pričnemo z mobilizacijo kostnega mozga katere shemo pripravi hematolog. Zdravilo dobiva v odmerku 5-10 mcg/kg telesne teže, dvakrat dnevno sub cutano v predel popka. Peti dan bolnik prejme oba odmerka hkrati ob 6. uri zjutraj, nato sledi odvzem ob 7. uri. Kontroliramo hemogram, elektrolite, kalcij, magnezij, fosfat, predvsem pa število KMC imenovanih CD34+.

V primeru, da je celic premalo, se mobilizacija podaljša. Sicer pričnemo z zbiranjem. Odvzem KMC poteka v bolniški sobi na oddelku pod nadzorom zdravnika transfuziologa in medicinske sestre.

### **Vloga medicinske sestre med mobilizacijo in na dan zbiranja KMC**

Medicinska sestra mora biti med mobilizacijo kostnega mozga s filgrastimom posebej pozorna na morebitne stranske učinke kot so bolečine v kosteh, splošna utrujenost bolnika, glavobol ali slabost ter alergijske reakcije. Pomembno je pravilno rokovanje z zdravilom. Ta mora pred aplikacijo vsaj pol ure stati na sobni temperaturi. Ves čas stimulacije kontroliramo nivo krvnega sladkorja na tešče. Poskrbeti moramo tudi za bolnikov počitek na dan zbiranja in presaditve ter ustrezno hidracijo med samim zbiranjem KMC. Bolnik je med zbiranjem priključen na monitor zaradi morebitnih motenj srčnega ritma. Nadzorujemo in beležimo njegove vitalne funkcije. Vse postopke in posege ustrezno dokumentiramo.

### **Vloga medicinske sestre na dan presaditve KMC**

Presaditev KMC je na prvi pogled enaka slikanju srčnih žil. Bolnika pripravimo po standardni metodi; kar pomeni, da se bolnik stušira oziroma mu pri tem nudimo delno ali popolno pomoč, preoblečemo mu osebno in posteljno perilo. Pred posegom mora biti vsaj štiri ure tešč. Ob vznožje namestimo peščeno vrečko za morebitno kompresijo vbodnega mesta. Po naročilu zdravnika bolnik zaužije premedikacijo (npr. Apaurin 5mg). Poskrbimo tudi za ustrezno beleženje postopkov in posegov na list zdravstvene nege ter pripravimo potrebno dokumentacijo. Nato bolnika odpeljemo v kateterski laboratorij.

Po končani presaditvi KMC bolnika takoj odpeljemo na scintigrafijo srca, kjer s pomočjo radioizotopa ocenijo uspešnost presaditve. Ves čas prevoza imamo bolnika priključenega

na monitor, nujno je tudi spremstvo zdravnika. Ko je preiskava končana, bolnika odpeljemo v enoto intenzivne terapije.

### **Vloga medicinske sestre v enoti intenzivne terapije po presaditvi KMC**

Ko bolnika sprejmemo v enoto intenzivne terapije, ga priključimo na monitor za spremljanje življenjskih funkcij. Zmerimo mu vitalne znake in posnamemo 12-kanalni EKG. Istočasno preverimo vbodno mesto v dimljah, po potrebi rano previjemo. Vbodno mesto tekom dneva kontroliramo večkrat. Poučimo ga glede ležanja z iztegnjeno okončino in možnosti zgodnjega vstajanja. Zelo pomembno je, da poskrbimo za ustrezno hidracijo in izločanje urina. Na dan posega bolnik zvečer lahko zaužije čisto juho, normalen obrok hrane pa šele naslednji dan. Razložimo mu tudi higienski režim na dan po presaditvi. Osvežilna posteljna kopel ter ustrezna anogenitalna nega sta nujna za preprečevanje okužb (Andročec, Trobec, Skok, 2002). Večkrat tudi kontroliramo laboratorijske izvide krvi (hemogram in troponin).

Bolnika odпустimo domov drugi dan po presaditvi KMC oz. ko se normalizirajo kontrolni izvidi krvi, predvsem levkociti in troponin. Vbodno mesto po invazivnem posegu mora biti brez hematoma ali slišnega šuma. Ob odpustu bolnik prejme navodila glede telesne aktivnosti, prehranskega režima, jemanja zdravil in na splošno glede zdravega načina življenja. Hkrati pridobi tudi datum kontrole v transplantacijski ambulanti na Polikliniki UKC Ljubljana. Kontrole se ponavljajo čez 1, 3, 6, 9 in 12 mesecev. Vsakič znova kontroliramo izvide krvnih preiskav, šest minutni test hoje, ultrazvok srca ter visokoločljivostni EKG.

### **Zaključek**

Presaditev KMC predstavlja pomemben segment zdravljenja napredovalega srčnega popuščanja. Z izboljšanjem metode se uspeh zdravljenja še povečuje. Kvaliteta življenja bolnika se na ta način izboljša, kar je razvidno iz kontrolnih pregledov v naši ambulanti. Zelo pomembno vlogo pri tem ima tudi medicinska sestra, saj s kvalitetno zdravstveno vzgojo doprinese k celotnemu uspehu zdravljenja.

### **Literatura**

1. Andročec V, Trobec K, Skok Z (2002). Zdravstvena nega bolnika po urgentnem koronarnem posegu. V: Urgentna medicina, izbrana poglavja. Ljubljana: Slovensko združenje za urgentno medicino. Portorož, 234-7
2. Janežič K (2011). Zdravstvena nega pacienta s srčnim popuščanjem po transplantaciji krvotvornih matičnih celic. Diplomsko delo. Ljubljana: Zdravstvena fakulteta.
3. Vrtovec B (2004). Epidemiologija in patogeneza srčnega popuščanja. V: Medicinska sestra ob bolniku s srčnim popuščanjem, Velenje, 12.-13. November 2004. Ljubljana: Zbornica zdravstvene nege Slovenije – Zveza društev medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov Slovenije, 5-8.
4. Vrtovec B (2008). Stem cell transplantation. [http://www.slo-heart.org/index.php?page\\_id=37](http://www.slo-heart.org/index.php?page_id=37). <12.2.2011
5. Poglajen G, Vrtovec B (2010). Zdravljenje napredovalega srčnega popuščanja. Za srce XVIII (3): 10-3

## Presaditev krvotvornih matičnih celic s sistemom NOGA<sup>®</sup> XP

**Hinko Urbančič, dipl.zn.**

Univezitetni klinični center, Ljubljana; Klinični oddelek za kardiologijo  
Kateterizacijski laboratorij  
[hinko\\_urbancic@yahoo.com](mailto:hinko_urbancic@yahoo.com)

### Izvleček

V prispevku je predstavljen sistem NOGA<sup>®</sup> XP, ki je namenjen presaditvi krvotvornih matičnih celic bolnikom z napredovalim popuščanjem srca. Navedene so posamezne komponente sistema in kako se jih pripravi za uporabo. Opisano je, kako sistem deluje in kakšne so njegove prednosti. Sistem zagotovi natančno porazdelitev aplikacij matičnih celic v označenem področju hibernirajočega miokarda.

**Ključne besede:** *srčno popuščanje, hibernirajoči miokard, 3D elektromehanska kartografija*

### Uvod

Osnova zdravljenja napredovelega srčnega popuščanja s presaditvijo matičnih celic je njihova lastnost, da se lahko v novem okolju spremenijo v novo celično vrsto. S poskusi na živalih so ugotovili, da se matične celice, vbrizgane v oboleli miokard, razvijejo v gladkomišične celice, endotelne celice in kardiomiocyte, pokazalo pa se je tudi, da imajo še parakrino delovanje, ki ima pomemben učinek tudi na nativni miokard (Vrtovec, Poglajen, 2011).

V kateterizacijskem laboratoriju Kliničnega oddelka za kardiologijo UKC Ljubljana opravljamo transplantacijo avtolognih krvnih matičnih celic v miokard levega ventrikla. Gre za manjši invazivni poseg v lokalni anesteziji, saj zdravnik punktira samo femoralno arterijo. Bolnik je ves čas pri zavesti. Med posegom je zagotovljena stalna monitorizacija bolnika zaradi nevarnosti motenj srčnega ritma, pripravljene smo tudi na takojšnje ukrepanje ob morebitnih zapletih. Po transplantaciji matičnih celic je bolnik premeščen v enoto intenzivne nege, kjer ostane na opazovanju še 24 ur. Mesečno opravimo 4 transplantacije.

Pomemben vidik zdravljenja z matičnimi celicami je, da bolniku vsadimo njemu lastne celice, s čimer se izognemo doživljenjskemu imunosupresivnemu zdravljenju in njegovim številnim, nemalokrat precej resnim stranskim učinkom (oportunistične okužbe, maligne bolezni, ledvična insuficienca, povišan krvni tlak, spremenjen metabolizem maščob in glukoze ipd.) (Vrtovec, Poglajen, 2011).

Transendokardno vsaditev matičnih celic izvajamo s pomočjo sistema NOGA<sup>®</sup> XP.

### Predstavitev sistema NOGA<sup>®</sup> XP

NOGA<sup>®</sup> XP je večkomponentni sistem (Slika 1). Sestavljen je iz:

- magnetne tuljave (location pad),

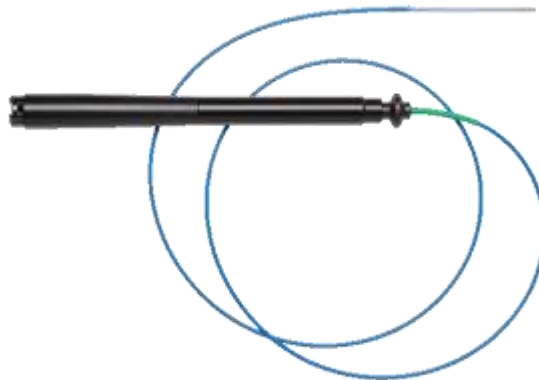
- delovno procesne enote (processingunit/workstation),
- upogljivega katetra za mapiranje srca (deflectable tip mappingcatheter- NogaStar<sup>®</sup>),
- referenčne elektrode in
- katetra za aplikacijo matičnih celic v miokard – MyoStar<sup>™</sup>



Slika 1: NOGA<sup>®</sup> XP je večkomponentni sistem  
Vir: <http://www.biosensewebster.com/bds/products-order.aspx>

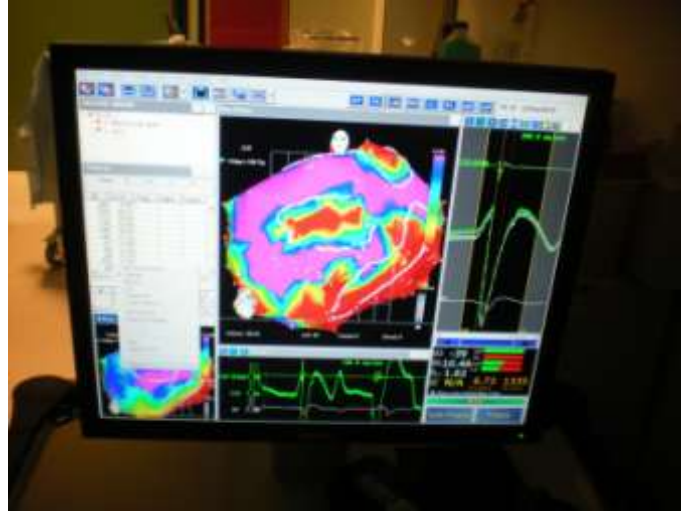
Za delovanje sistem potrebuje ultra nizko magnetno polje, ki ga proizvaja magnetna tuljava (location pad), nameščena na operacijsko mizo in locirana v višini bolnikovega prsnega koša. V tem magnetnem polju je treba ustvariti tudi referenčno točko, ki bo ves čas posega na istem mestu. To dosežemo tako, da bolniku na hrbet nalepimo referenčno elektrodo v višini levega srčnega ventrikla. Referenčna elektroda je fiksno pritrjena na hrbet bolnika, zato je treba magnetno tuljavo naravnati tako, da je ta elektroda stalno v njeni sredini. Zato se tudi bolnik med posegom ne sme premikati. Sistem potrdi pravilno ustvarjeno referenčno točko z zeleno piko v magnetnem polju.

NogaStar<sup>®</sup> kateter za mapiranje (Slika 2) ima v svoji konici miniaturne pasivne magnetne senzorje, ki omogočajo natančno zaznavanje tako lokacije katetra kot tudi njegovo orientacijo v prostoru. Kateter ima tudi standardne elektrode, ki merijo lokalne unipolarne in bipolarne električne signale endomiokarda (Psaltis, Worthley, 2009).



Slika 2: NogaStar<sup>®</sup> kateter za mapiranje  
Vir: <http://www.biosensewebster.com/bds/products-order.aspx>

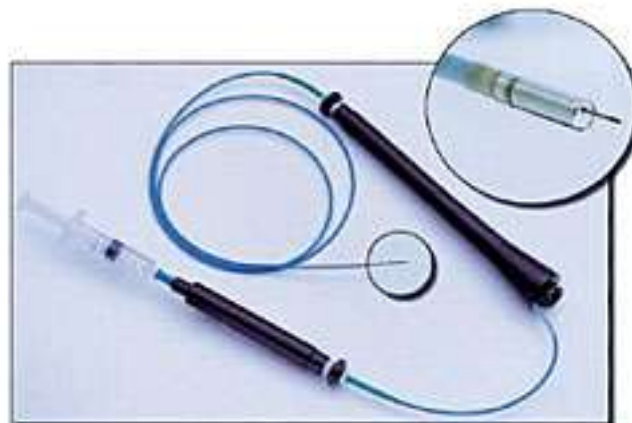
Z NogaStar<sup>®</sup> katetrom za mapiranje se zdravnik sprehaja po endokardni površini levega ventrikla in s pomočjo zmogljivega NOGA<sup>®</sup> XP računalnika riše 3D sliko srca v realnem času (Slika 3).



Slika 3: Sistem NOGA<sup>®</sup> XP izriše 3D sliko srca in loči področja brazgotine in zdravega miokarda (Foto: Urbančič, 2012)

Ko se zdravnik s konico katetra dotika notranje površine levega ventrikla, iz teh točk pobira informacije o lokalni električni aktivnosti, ki je izražena v mV, in o lokalni kontraktilnosti oz. krčljivosti miokarda, ki se izraža v odstotkih. Računalnik te podatke barvno kodira in izdela barvno sliko srca, ki pokaže, kje se nahajajo področja brazgotin (brez električne aktivnosti in brez krčljivosti) in kje je zdrav miokard (višja električna aktivnost in višja krčljivost). Sistem tako omogoča, da se označijo tista področja, ki so najbolj primerna za transplantacijo matičnih celic. To je mejno področje med zdravim miokardom in brazgotino, ki se imenuje hibernirajoči miokard. Ta je električno še aktiven, vendar pa se ne krči več (Vrtovec, Poglajen, 2011).

Ko je tridimenzionalni prikaz levega ventrikla končan in računalnik prikaže področja, kjer naj bi se injiciralo matične celice, zdravnik zamenja kateter za mapiranje z drugim katetrom, ki se imenuje MyoStar<sup>™</sup> (Slika 4). Prirejen je za direktno injiciranje matičnih celic v miokard, saj ima na koncu zelo tanko iglo, ki se jo sproži med aplikacijo, drugače pa je ta igla skrita v notranjosti katetra.



Slika 4: MyoStar<sup>™</sup> kateter za apliciranje

Vir: [http://texasheart.org/Research/StemCellCenter/Stem\\_Cell\\_Basics.cfm](http://texasheart.org/Research/StemCellCenter/Stem_Cell_Basics.cfm)

Prednost sistema NOGA<sup>®</sup> XP je, da zagotavlja vidnost katetra med injiciranjem. Zdravnik se tako lahko zelo natančno približa označenemu področju za presaditev matičnih celic. Mesta injiciranja matičnih celic sistem označi s temno rdečimi pikami. Na ta način so aplikacije porazdeljene enakomerno po označenem področju. Sistem na ta način omogoča zelo precizno intramiokardno implantacijo matičnih celic.

NOGA<sup>®</sup> XP sistem omogoča 3D izris votline levega ventrikla v realnem času. Zdravnik tako dobi informacijo tudi o velikosti in obliki srčne votline. Najpomembnejši podatek pa je seveda, kje so področja brazgotine in kje je še delujoči miokard. Uspešnost aplikacije krvotvornih matičnih celic sistem omogoča z natančnim izrisom področja hibernirajočega miokarda in vidnostjo katetra za injiciranje. Tako se lahko zdravnik s katetrom zelo natančno približa zelenemu mestu za aplikacijo. Vsaka aplikacija je označena s temno rdečo piko, zato so lahko porazdeljene enakomerno po označenem področju. To je pomembno zato, ker je matičnih celic le par mililitrov in je število aplikacij omejeno.

### **Zaključek**

Prednost uporabe sistema NOGA<sup>®</sup> XP je v tem, da sistem zagotavlja vidnost katetrov brez uporabe rentgenskih žarkov in izdela 3D sliko izbrane srčne votline v realnem času ter loči brazgotinsko tkivo od zdravega miokarda. Omogoča natančno aplikacijo krvnih matičnih celic v izbrano področje miokarda. Cilj take transendokardne presaditve krvnih matičnih celic je ponovna mobilnost tega dela miokarda.

### **Literatura**

1. Biosense Webster Products and Ordering Information (BDS) dostopno na: <http://www.biosensewebster.com/bds/products-order.aspx>
2. Psaltis PJ, Worthley SG. Endoventricular Electromechanical Mapping — The Diagnostic and Therapeutic Utility of the NOGA<sup>®</sup> XP Cardiac Navigation System. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2009;2:48–62.
3. Vrtovec B, Poglajen G. Sodobni načini zdravljenja srčnega popuščanja. *Zdrav Vestn.* 2011;80:302–15.



**NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI  
V ORTOPEDIJI**



## Zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca z gojenimi avtolognimi hondrociti

**Doc. dr. Matej Drobnič, dr. med., David Martinčič, dr. med.**

Univezitetni klinični center, Ljubljana; Ortopedska klinika  
Oddelek za artroskopijo in poškodbe pri športu

### Izvleček

Število najdenih poškodb sklepnega hrustanca je v porastu. Zaradi omejenih zmožnosti obnove sklepnega hrustanca vodijo v progresivno sklepno bolečino z omejitvami v vsakodnevnih aktivnosti, kar privede do slabše kvalitete življenja. V zadnjih letih se je zato razvilo več različnih metod zdravljenja, s katerimi lahko popravimo poškodovani hrustanec in izboljšamo simptome ter zmanjšamo možnost prezgodnje degeneracije sklepnega hrustanca. Pomembno mesto med njimi ima prav gotovo vsaditev avtolognih gojenih hondrocitov. Vse metode kot tudi slednja pa imajo svoje omejitve: primerne so za lokalizirane nedegenerativne lezije hrustanca, pri nekaterih je težava v slabši kvaliteti in obstojnosti novonastalega hrustanca, pri nekaterih pa pride tudi do težav na mestu odvzema hrustanca. Zgodnji klinični rezultati nekaterih novih metod in izboljšav starih pa že dajejo spodbudne rezultate za nadaljnje izboljšanje zdravljenja teh kompleksnih poškodb.

**Ključne besede:** *sklepni hrustanec, hondrociti, sklepne poškodbe*

### Uvod

Hrustančne poškodbe nastanejo pri delovanju neposredne sile na kolenski sklep (npr. udarci), še pogosteje pa posredno pri rotacijskih poškodbah kolenskih vezi. Po globini jih razdelimo na poškodbe delne debeline (ni zajet celoten hrustanec), poškodbe celotne debeline (segajo do subhondralne kosti) ter osteo-hondralne poškodbe (segajo tudi v kost).

Poglavitna razloga za slabo celjenje hrustančnih poškodb sta: hrustančne celice se ne razmnožujejo in hrustanec nima žilja. Po poškodbah, ki ne segajo v kost, lahko sosednji hondrociti povečajo tvorbo medceličnine, kar pa zadostuje samo za polnjenje manjših razpok. Kadar hrustančna poškodba prebije subhondralno kost, pride do krvavitve v lezijo. To omogoča razraščanje vezivne hrustančevine, ki je biomehansko manj odporna od hialinega hrustanca in lahko kasneje, predvsem v večjih lezijah, degenerira. Lezije hrustanca s premerom več kot 1 cm povzročajo izrazito povečane obremenitve na robovih, zato imajo tendenco širjenja v okolico ter lahko vodijo v zgodnjo artrozo kolena. Posebej so problematične lezije, ki ležijo na patološko obremenjenih delih kolena, npr. zunanji del pogačice pri patelo-femoralni displaziji ali medialni kondil pri varusni konstituciji (Radosavljevič et al 2003). Bolniki s poškodbami hrustanca tožijo predvsem zaradi bolečin v kolenu. Bolečine lahko spremljajo otekanje ter mehanski simptomi (zaskoki, preskoki), zaradi nestabilnih delov hrustanca ali prostih teles.

## **Načini zdravljenja hrustančnih lezij**

### **Konzervativno zdravljenje**

Simptomatsko zdravljenje predstavljajo nekirurški postopki, s katerimi blažimo bolečine, otekanje, slabo gibljivost ter preskakovanje v sklepu. V ta okvir sodijo punkcije sklepa, analgetiki oz. NSAR ter strukturirana fizikalna terapija.

### **Kirurško zdravljenje**

#### ***Paliativno kirurško zdravljenje***

Ključni del takšnega zdravljenja je artroskopski debridement, pri čemer odstranimo prosta telesa in nestabilne dele hrustanca. Prav tako lahko zgladimo robove lezije. S temi ukrepi lahko zmanjšamo mehanske težave v sklepu (zaskoki, aretacije, otekanje). Vpliv na bolečino, povezano s hrustančno poškodbo, je nepredvidljiv. Debridement je velikokrat uspešen pri poškodbah manjše velikosti (premer do 1 cm). Prednost tovrstnega zdravljenja so enostavnost, nizka cena in hitra rehabilitacija. Slabost pa zgodnje degenerativne spremembe sklepa.

#### ***Reparativno kirurško zdravljenje***

To je zdravljenje, s katerim aktivno posežemo na mesto poškodovanega hrustanca z namenom, da se le-to zapolni z nadomestnim (reparativnim) tkivom. Za zagotavljanje ustrezne funkcije morajo biti biomehanske lastnosti nadomestnega tkiva čim bolj podobne naravnemu hialinemu hrustancu. Razlikujemo tri glavne pristope (Mithoefer, Mandelbaum, 2009):

##### ***1. Presaditev celotnega osteohondralnega presadka***

- Pričvrstitev odlomljenih delov kosti in hrustanca nazaj v ležišče lahko opravimo, ker se hrustanec prehranjuje iz sinovialne tekočine, zato celice ostanejo žive.
- Presaditev avtolognih kostno-hrustančnih čepov (mozaična plastika) je metoda, pri kateri prestavimo kostno-hrustančne čepe iz manj obremenjenih delov kolena na bolj obremenjeno mesto, kjer je poškodovan hrustanec (Radosavljevič et al. 2003).
- Presaditev (kostno) hrustančnega tkiva mrtvih dajalcev posega v področje transplantacijske dejavnosti. Uporabljajo se sveža tkiva, saj konzervacija uniči hondrocite, ki so ključni za dolgoročno funkcionalnost transplantata. Tovrstne preskrbe v Sloveniji nimamo.

##### ***2. Metode s stimulacijo kostnega mozga***

- Mikrofrakture so sedaj najpogosteje uporabljena metoda za zdravljenje manjših (do 2 cm<sup>2</sup>) dobro omejenih hrustančnih poškodb. Tehnika se izvede artroskopsko. Najprej mesto poškodbe počistimo do stabilnih robov, nato s posebnimi šili predremo subhondralno kost na več mestih (Steadman et al. 2010).
- Vsaditev sintetičnih nosilcev, ki se ob sami vsaditvi prepojijo z aktivnimi celicami iz krvi ali kostnega mozga. V zadnjih petih letih se pojavljajo kot alternativna rešitev celičnim tehnologijam. Prednost je enostopenjski poseg, izognitev gojenju celic ter trajnost implantatov za shranjevanje (Mithoefer, Mandelbaum, 2009).

##### ***3. Vsaditev aktivnih celic, ki bodo nadomestno tkivo šele izgradile***

- Vsaditev avtolognih gojenih hondrocitov, ki je opisana spodaj.

## **Vsaditev avtolognih gojenih hondrocitov**

Največji napredek pri nadomestnem zdravljenju hrustančnih poškodb je pomenil prehod tkivnega inženirstva v ortopedijo, kar se je pričelo z uporabo gojenih avtolognih hondrocitov na Švedskem konec 90-ih let preteklega stoletja (Peterson, 2010). Metodo so poimenovali vsaditev avtolognih hondrocitov (*autologous chondrocyte implantation – ACI*). ACI temelji na gojenju lastnih hrustančnih celic zunaj človeškega telesa. Ko celice izoliramo iz hrustančnega tkiva, se vrnejo na predstopnjo v svojem razvoju (dediferenciacija) in ponovno pridobijo sposobnost razmnoževanja, ne morejo pa več izgrajevati makromolekul, značilnih za sklepnih hrustanec. Ko se njihovo število ustrezno poveča (približno 1 milijon celic na 1 cm<sup>2</sup> poškodovanega hrustanca), je mogoče proces obrniti: razmnoževanje se ustavi, postopno se vzpostavi gradnja tipičnih makromolekul (rediferenciacija) (Radosavljevič et al, 2003).

Sama vsaditev hondrocitov se je postopno razvijala. Prvotna metoda vsaditve, ki je temeljila na vbrizgavanju celične supenzije pod periostalni pokrov, prišit na robove lezije, se danes le redko uporablja. V začetku novega stoletja so namreč periost pričele nadomeščati razgradljive membrane, v zadnjih letih pa večina vsaditev hrustančnih celic poteka na celičnih nosilcih (Mithoefer, Mandelbaum, 2009). Slednji omogočajo lažjo, hitrejšo in manj invazivno operativno metodo. Večino vsaditev opravimo sedaj z majhnimi dostopi v sklep – tj. z mini artrotomijo. Določeni tipi nosilcev in ugodna lokacija lezije omogočajo tudi artroskopske vsaditve. Največji razvoj je usmerjen v izdelavo kombiniranih nosilcev za kost in hrustanec, v enostopenjski način vsaditve ter v alternativne vire celic, tako da ne bo več potreben odvzem z roba sklepa. V teku je vse več randomiziranih študij, ki imajo namen ugotoviti, kolikšne so prednosti sorazmerno drage ACI metode v primerjavi z drugimi metodami.

## **Spremljajoči posegi na kolenu in ob njem**

Za uspešno razraščanje reparativnega hrustančnega tkiva mora biti kolenski sklep stabilen ter mehansko uravnotežen. Ta dva pogoja zagotovimo z operativnimi posegi, ki jih izvedemo pred obnavljanjem sklepne površine ali sočasno z njo. Stabilnost sklepa zagotavljamo z rekonstrukcijami sklepnih vezi, kjer prednjači prednja križna vez. Biomehansko uravnoteženost sklepa zagotavljamo z razbremenitvenimi osteotomijami ob kolenu. Sem sodijo predvsem: valgizacijska osteotomija proksimalne tibije (pri medialnih lezijah), varizacijska osteotomija distalnega femurja (pri lateralnih lezijah) ter antero-medializacija pogačice (pri patelo-femoralnih lezijah). V sklop ohranitvene kirurgije kolena sodijo tudi nadomestki meniskusa, bodisi kot donorski transplantati pri popolnih odstranitvah bodisi kot sintetični nadomestki po parcialnih odstranitvah meniskusa.

## **Po-operativna rehabilitacija pri posegih na hrustancu**

Za izgradnjo kvalitetnega nadomestnega tkiva mora biti v zgodnjem rehabilitacijskem obdobju (praviloma dva meseca) vsadek zaščiteno pred preobremenitvami, hkrati pa mora biti izpostavljen nadzorovanemu mehanskemu stimulusu. Razbremenitev dosežemo z uporabo bergel, kar običajno traja šest tednov. V posebnih primerih prejmejo bolniki tudi razbremenitveno ortozo (angl. *unloader brace*). Mehansko stimulacijo vsadka med zgodnjo rehabilitacijo dosežemo s pasivnim razgibavanjem (začetni del – električna

opornica, nadaljevalni del – sobno kolo), izometričnimi vajami ter mišično elektrostimulacijo. Po zaključenem zgodnjem rehabilitacijskem obdobju je protokol rehabilitacije prilagojen operativni metodi, velikosti in lokaciji lezije ter spremljajočim posegom. Okvirno so bolniki sposobni za lažjo hojo po dveh mesecih, za obziren tek po štirih mesecih, za polne obremenitve kolena pa med šest do 18 meseci po posegu.

### **Naši dolgoročni rezultati**

Opravljen je bila desetletna analiza rezultatov zdravljenja v Sloveniji. Vključenih je bilo 31 pacientov, ki so bili razdeljeni v tri skupine, in sicer: v skupino s fokalnimi lezijami hrustanca, skupino z diagnozo osteohondritis disekans ter skupino z lezijami s pridruženo poškodbo sprednje križne vezi. Subjektivno se je stanje pacientom glede na predoperativno obdobje signifikantno izboljšalo že po dveh letih in ostalo stabilno do deset let po operaciji. Kljub izboljšanju pa večini pacientov ni uspelo priti do enake stopnje aktivnosti kot pred poškodbo. Radiološke znake osteoartroze smo po desetih letih našli pri 45 % pacientov, več v skupinah s fokalno lezijo in pridruženo poškodbo sprednje križne vezi.

### **Zaključek**

Poškodba sklepnega hrustanca za pacienta pomeni bolečine, omejene dnevne aktivnosti ter slabšo kakovost življenja. Novejše metode zdravljenja, med katerimi ima pomembno vlogo zdravljenje z implantacijo gojenih hondrocitov, ki so varne in uspešne tudi na dolgi rok (Peterson, 2010), lahko izboljšajo kvaliteto življenja ali celo vrnitev k izvajanju težjih športnih aktivnosti. Kot vsako zdravljenje pa ima tudi to svoje omejitve in slabosti (Harris, 2011). V klinično uporabo prihajajo nove in izboljšane metode zdravljenja sklepnega hrustanca, ki kažejo obetavne zgodnje klinične rezultate.

### **Literatura**

1. Radosavljevič D, Drobnič M, Gorenšek M, Koritnik B, Kregar-Velikonja N, Maličev E, Jeras M, Knežević M. Operativno zdravljenje okvar sklepnega hrustanca. *Medicinski razgledi* 2003; 42:47-57.
2. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture: Its history and experience of developing surgeon. *Cartilage* 2010; 2(1):78-86.
3. Mithoefer K, Mandelbaum BR. Current treatment methods for articular cartilage injury. *European Musculoskeletal Review* 2009; 4(2):108-112.
4. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2010; 38(6):1117-24.
5. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation – a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(7):779-91.

## **Odvzem krvi in priprava seruma za gojenje avtolognih hondrocitov**

**Zvone Nagode, dipl. zn., Ana Marija Kovačič Tonejc, dipl. m. s.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

### **Izvleček**

V prispevku je predstavljena vloga medicinske sestre ob sprejemu pacienta - krvodajalca, odvzem enote polne krvi in priprava seruma za gojenje avtolognih hondrocitov. Ob tem se upoštevajo zahteve sistema kakovosti, predpisani zakoni, pod-zakonska določila, priporočila in standardni operativni postopki. To zagotavlja varnost odvzema krvi za pripravo seruma. Medicinska sestra ima pomembno vlogo pri odvzemu krvi pacientu in pri pripravi seruma.

Iz računalniške baze podatkov informacijskega sistema DATEC na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani so pridobljeni podatki o odvzemih krvi za pripravo seruma v obdobju od 1996 do 2012. V sedemnajstih letih je bilo izvedeno 244 odvzemov krvi. Število priprav seruma je v prvih letih strmo naraščalo, nato pa se nadaljevalo z manjšimi nihanji. Pacienti so bili večinoma moški, stari od dvajset do štirideset let. Samo v štirih primerih priprava seruma za gojenje avtolognih hondrocitov ni bila uspešno.

**Ključne besede:** *avtologni hondrociti, venepunkcija, serum*

### **Uvod**

Kri je živo tkivo s številnimi funkcijami. V genetskem zapisu krvnih celic sta zapisani preteklost in posebnost vsakega posameznika in vsakega naroda. Zato kri v državah z razvitim krvodajalstvom smatrajo za nacionalno dobrino.

V času, ko družbene spremembe vplivajo na število krvodajalcev (Lamprecht, Slabe, 1998), ko se pojavlja vse več bolezni, ki se prenašajo s krvjo (Levičnik, 1997), je zelo pomembno, da postanejo ljudje osveščeni o pomenu avtotransfuzije, kot najbolj varni transfuziji, kjer je dajalec krvi in prejemnik krvi in krvnih pripravkov ista oseba (Miglič Seršen, 2003).

Z razvojem in novimi dognanji v medicini imajo tudi pacienti s poškodbo sklepnega hrustanca ali degeneracijskimi spremembami (najpogosteje v kolenskem sklepu) več možnosti, da se njihovo zdravljenje uspešno zaključi. V poškodovani sklep implantirajo celice hondrocitov gojenih v avtolognem serumu poškodovanca (Maličev, 2003). Na ZTM se priprava avtolognega seruma za gojenje avtolognih hondrocitov izvaja od leta 1996, torej že sedemnajst let. V prvih letih je bil to projekt, kateri je zaradi dobrih rezultatov na področju zdravljenja poškodb sklepnega hrustanca prešel v klinično prakso.

Prispevek predstavlja pregled podatkov o odvzemih krvi za pripravo seruma v informacijskem sistemu DATEC na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM) v obdobju od 1996 do 2012. Zbrani so podatki o številu pacientov, kateri so dali kri za pripravo seruma, njihova struktura po spolu in starosti, iz katerih klinik so bili poslani in uspešnost priprave seruma.

## **Vloga medicinske sestre pri venepunkciji**

Pri pacientih, ki pridejo na odvzem krvi za pripravo avtolognega seruma načrt zdravstvene nege temelji na izobraževanju samega pacienta, odvzemu krvi in pripravi seruma za gojenje avtolognih hondrocitov.

Indikacijo za zdravljenje pacienta s hondrociim implantatom postavi specialist ortoped ali pa specialist travmatolog, ki pacienta napoti na odvzem krvi. Zaradi narave poškodbe (koleno) pacient najpogosteje ne more priti na ZTM tako, da se odvzem krvi izvede v oddelčni ambulanti klinike, kjer je pacient hospitaliziran. V tem primeru se osebje klinike prehodno dogovori z zdravnikom na ZTM za dan in uro odvzema.

Medicinska sestra, ki izvaja postopek odvzema krvi bolniku na kliniki, pripravi naročilnico za terapevtske storitve, naročilnico za mikrobiološke preiskave, list krvodajalca v katerega na kliniki vpiše vse zahtevane podatke o pacientu, vprašalnik za bolnike v postopku predoperativne avtotransfuzije, talon etiketo s številko odvzema, enojno vrečko za zbiranje krvi brez antikoagulant, 1 testno epruveto K2E á 6 ml, tehtnico na poteg, predtiskano osnovno etiketo, Esmarchovo prevezo, dezinfekcijsko sredstvo za kožo, sterilne tampone, elastični povoj, akumulatorski varilec vrečk, sterilne peane, škarje, zaščitne rokavice za enkratno uporabo, posodo za infektivne odpadke.

Kadar pacient lahko hodi se odvzem krvi izvede na ZTM v ambulanti za avtotransfuzijo. V sprejemni pisarni na ZTM vnesejo njegove osebne podatke v računalniško informacijski sistem in natisnejo List krvodajalca. Medicinska sestra, ki izvaja postopek odvzema krvi, pacienta sprejme, se mu predstavi in pregleda dokumentacijo (obvestilo zdravniku, laboratorijski izvid). Preveri identiteto pacienta na njegovem Listu krvodajalca in ga pospremi v laboratorij, kjer se mu odvzame vzorec venozne krvi za hemogram. Po opravljenem laboratorijskemu odvzemu krvi medicinska sestra odpelje pacienta v ambulantu za avtotransfuzijo, kjer pacient izpolni vprašalnik za bolnike v postopku predoperativne avtotransfuzije. Na List krvodajalca medicinska sestra prilepi koda bar številko zaporednih odvzemov in pokliče zdravnika. Vsak odvzem krvi za pripravo seruma se vrši pod nadzorom zdravnika, kater na podlagi pregleda pacienta, laboratorijskih izvidov ter vprašalnika presodi ali je pacient sposoben za odvzem krvi.

Na ZTM je izdelan standard za venepunkcijo v Standardnih operativnih postopkih (SOP), ki zagotavlja pacientu boljšo oskrbo in večjo varnost, medicinski sestri pa strokovno pomoč in boljši nadzor nad delom. Odvzem krvi je kompleksen postopek, ki zahteva tako znanje kot tudi spretnosti njenih izvajalcev.

## **Priprava pacienta na odvzem krvi**

Medicinska sestra pacientu pomaga, da se udobno namesti na stol za odvzem krvi. Pomembno je, da je pacient sproščen, da ga ne motijo zunanji vplivi okolja. Pripravi si ustrezno vrečko za zbiranje krvi, pregleda rok uporabe, iglo, zunanost vrečke, da ta ni poškodovana. Vrečko namesti na tehtnico, ki je vedno v nižjem položaju od položaja roke. Za venepunkcijo si medicinska sestra izbere veno v komolčni jami, primerne debeline, tonusa in gibljivosti (Pivk, 2003). Nato pacientu namesti Esmarchovo prevezo 10 – 15 cm nad komolcem. Bolnika prosi, da stisne pest. Ob tem se žile napnejo in vidno izstopijo. Mesto venepunkcije se čisti z antiseptičnim sredstvom 30 sekund. Po preteku dodatnih 30

sekund medicinska sestra odstrani ščitnik z igle, fiksira žilo tako, da s palcem proste roke napne kožo pod mestom venepunkcije in vbode pod kotom 45° malo nižje od mesta, ki ga izbere za venepunkcijo. Ko je igla v podkožju se naklon zniža in pritisne 2/3 dolžine igle v lumen vene (SOP, 2012). Na začetku odvzema krvi medicinska sestra odvzame vzorec krvi za virusne markerje (iz posebne "blazinice", ki je sestavni del odvzemne vrečke). Medicinska sestra med odvzemom opazuje pacienta in mesto venepunkcije. Skrbi za dobro počutje pacienta in nadzoruje njegovo odzivanje na odvzem krvi. Ko je v odvzemni vrečki 200 do 250 ml krvi, avtomatska tehtnica v katero so bili vnešeni podatki o predpisani količini, sama prekine pretok krvi. Medicinska sestra zaključi odvzem tako, da sprosti Esmarchovo prevezo in odvari cevko, ki je povezovala zbirno vrečko in mesto venepunkcije. Mesto venepunkcije pokrije s sterilnim tamponom in potegne iglo iz vene. Pacienta prosi, da pritisne preko tampona na mesto venepunkcije. Sistem odvrže v posodo za infektivni material. S pomočjo in tamponom naredi kompresijo na mestu venepunkcije (SOP, 2012). Pacient nato počiva še 5-10 minut. Medicinska sestra mu svetuje naj ima mesto venepunkcije povito vsaj dve uri, naj roke ne obremenjuje in naj pije čim več tekočine. Ko se medicinska sestra prepriča, da se pacient po odvzemu krvi dobro počuti, mu pomaga vstati in ga napoti na okrepčilo v jedilnico za krvodajalce.

Možni zapleti pri venepunkciji so: hematoma, dermatitis, absces in flegmona, poškodba živca, tromboflebitis ter punkcija arterije. Če venepunkcija ni uspešna, se lahko celoten postopek ponovi čez teden do deset dni.

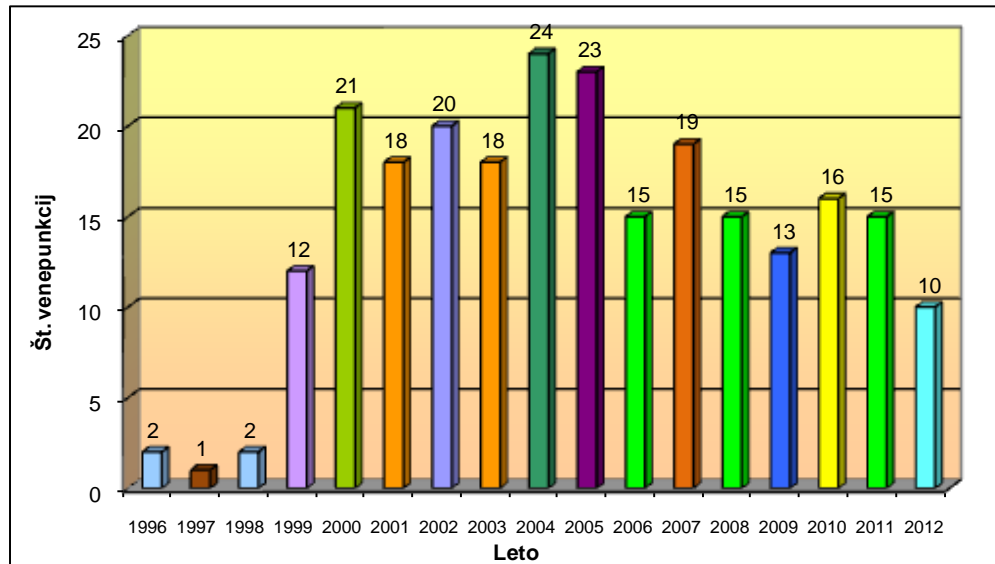
### **Priprava seruma za gojenje avtolognih hondrocitov**

Uspešna venepunkcija in odvzem krvi pacientu je pogoj za pripravo avtolognega seruma za gojenje hondrocitov. Serum se pripravi iz sveže polne krvi enega dajalca, vzeto v enojno vrečko brez antikoagulantov, z odstranitvijo celic in krvnega strdka. Serum ne vsebuje faktorjev strjevanja krvi. Iz 1 ml krvi se pridobi 0,4 ml seruma (Pivk, 2003).

Medicinska sestra na enojno vrečko odvzete krvi privari satelitno vrečko, ki služi za zbiranje seruma ob končanem postopku. Vrečko z odvzeto polno krvjo vstavi med grelni blazini aparata za odmrzovanje in ogrevanje komponent krvi. Skozi grelni blazini se pretaka ogrevana voda s temperaturo 37 °C. Polna kri je v aparatu 6 do 8 ur. V tem času se naredi krvni strdek (SOP, 2011). Nato se vrečko postavi v centrifugo, kjer se opravi centrifugiranje po določenem programu. Po končanem centrifugiranju medicinska sestra previdno vstavi vrečko v avtomatski ločevalec in z izbranim programom iztisne serum v prazno satelitno vrečko. Tako pripravljen serum opremi z ustrezno predtiskano etiketo na katero napiše datum izdelave, volumen seruma in nalepi številko krvi. Krvni pripravek – serum vnese v računalnik. Naročniku se izda serum skupaj z vrečko s krvnim strdkom (SOP, 2012).

### **Pregled podatkov o odvzemih za pripravo seruma**

Iz baze podatkov informacijskega sistema DATEC na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM) so pridobljeni podatki o odvzemih krvi za pripravo seruma V obdobju od leta 1996 do konca leta 2012 je bilo opravljeno skupaj 244 odvzemov krvi za pripravo seruma. Število odvzemov krvi po letih prikazuje Graf 1.



Graf 1: Število odvzemov krvi za pripravo seruma od leta 1996 do leta 2012

Prva tri leta so bili izvedeni le posamezni odvzemi krvi. Večji porast odvzemov se prične v letu 1999, ko je bilo izvedeno 12 venepunkcij. V naslednjih letih se je število odvzemov krvi za pripravo seruma gibalo od 10 leta 2012 do 24 leta 2004.

Iz 224 uspešno izvedenih odvzemov krvi za pripravo seruma je bilo uspešno pripravljenih 240 serumov. V štirih primerih pa je prišlo do tehnične napake pri pripravi seruma - poškodba vrečke v času centrifugiranja.

Med 244 pacienti, ki so prišli na odvzem krvi za pripravo seruma je bilo 76,2 % moških in 23,8 % žensk.

Povprečna starost pacientk je bila 30 let in 6 mesecev, pacientov pa 32 let in 3 mesece. Najmlajša pacientka je bila stara 13 let in 7 mesecev, najstarejša pa 48 let in 2 meseca. Pri pacientih je bil najmlajši star 16 let in 3 mesece, najstarejši pa je imel 51 let in 1 mesec.

Največ žensk (31%) je bilo v starostnem obdobju od 20 do 29 let in 27,6% med 30 in 39 let. Pri moških je bilo največ pacientov (35,5 %) v starostnem obdobju od 30 do 39 let in 35% od 20 do 29 let.

Največ odvzemov krvi za pripravo avtolognega seruma (182 / 74,6 %) je bilo opravljeno za paciente iz Ortopedske klinike Ljubljana. Iz Travmatološke klinike Ljubljana je bilo napotenih na odvzem krvi za pripravo seruma 56 pacientov oz. 22,9 %. 6 pacientov oz. 2,5% pa je bilo napotenih iz ustanov izven Ljubljane.

## Zaključek

Medicinska sestra ima pomembno vlogo pri odvzemu krvi pacientu in pripravi seruma za gojenje avtolognih hondrocitov. Varnost odvzema krvi in priprave seruma je zagotovljena z upoštevanjem sistema kakovosti, zakonskih določil in standardno operativnih postopkov.

## **Zahvala**

Avtorja se za pomoč pri pridobivanju podatkov iz računalniške baze IS DATEC zahvaljujeva sodelavki Darinki Čepon, dipl. m. s.

## **Literatura**

1. Lampreht N, Slabe D. Krvodajalstvo kot izziv družbene zavesti. V: Dobra transfuzijska praksa. 1. podiplomski seminar o zdravljenju s krvjo v kirurgiji. Ljubljana: Zavod R Slovenije za transfuziji krvi: Klinični center, 1998.
2. Levičnik S. Ukrepi za preprečevanje prenosa HIV okužb s transfundirano krvjo in krvnimi produkti. V: Klinični simpozij o aidsu. Ljubljana: Med Razgl 1997; 65 – 79.
3. Maličev E. Optimizacija postopka transplantacije avtolognih hondrocitov in študije imunogenosti hrustanca. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 2003.
4. Miglič Seršen M. Osveščenost dajalcev za avtologni odvzem na zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Diplomsko delo. Maribor: Visoka zdravstvena šola, 2003.
5. Pivk B. Laboratorijska hematologija. Velike Lašče: Elanda, 2003.

## **Drugi viri**

1. Standardni operativni postopki. SOP-P.Z13 Priprava mesta venepunkcije. Oddelek za konzervacijo in predelavo krvi. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2012.
2. Standardni operativni postopki. SOP-P.Z14 Venepunkcija. Oddelek za konzervacijo in predelavo krvi. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2012.
3. Standardni operativni postopki. SOP-P.Z16 Zaključek odvzema. Oddelek za konzervacijo in predelavo krvi. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2012.
4. Standardni operativni postopki. SOP-P.P27 Ravnanje z aparatom za odmrzovanje in ogrevanje komponent krvi Barkey Plasmatherm. Oddelek za konzervacijo in predelavo krvi. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2011.
5. Standardni operativni postopki. SOP-P.M20 Priprava seruma. Oddelek za konzervacijo in predelavo krvi. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 2012.
6. Računalniška baza podatkov IS DATEC. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Ljubljana, 1996 – 2012.

## Gojenje hondrocitov za zdravljenje poškodb sklepnega hrustanca

**dr. Nevenka Kregar Velikonja, univ.dipl.biol., dr. Ariana Barlič, univ.dipl.biol., dr. Mirjam Fröhlich, univ.dipl.biol., doc.dr. Miomir Knežević, univ.dipl.biol.**

Educell d.o.o., Prevale 9, 1236 Trzin  
nevenka.kregar-velikonja@educell.si

### Izvleček

**Teoretična izhodišča** Hrustančno tkivo ima slabo sposobnost obnavljanja, zato se je pred skoraj dvema desetletjema pojavila ideja o obnovi poškodovanega hrustanca s celicami, izoliranimi iz koščka hrustančnega tkiva in namnoženimi v laboratoriju. V naši skupini smo med prvimi v svetu sledili tem idejam in razvili različne oblike celičnega produkta.

**Metode** Ob razvoju celičnih produktov za obnovo sklepnega hrustanca smo poleg metod za gojenje celičnih kultur (2D in 3D kultur na različnih materialih) razvijali tudi metode za preverjanje živosti, aseptičnosti in fenotipa celičnih kultur. Proučevali smo tudi primernost nekaterih alternativnih virov celic za tovrstno aplikacijo.

**Diskusija in zaključki** Razvoj celičnega produkta za regeneracijo sklepnega hrustanca je rezultiral v treh generacijah produkta: ChondroArt 1D, ChondroArt 2D in ChondroArt 3D. V vseh treh oblikah produkta se kot vir celic uporablja biopt sklepnega hrustanca, saj je zaradi postopka artroskopske diagnostike, najlažje dostopen vir celic za to aplikacijo.

Razvoj novih produktov v svetu poteka predvsem v smeri razvoja alogenskih aplikacij, uporabe matičnih celic in naprednih biomaterialov, ki spodbujajo in omogočajo obnovo hrustančnega tkiva.

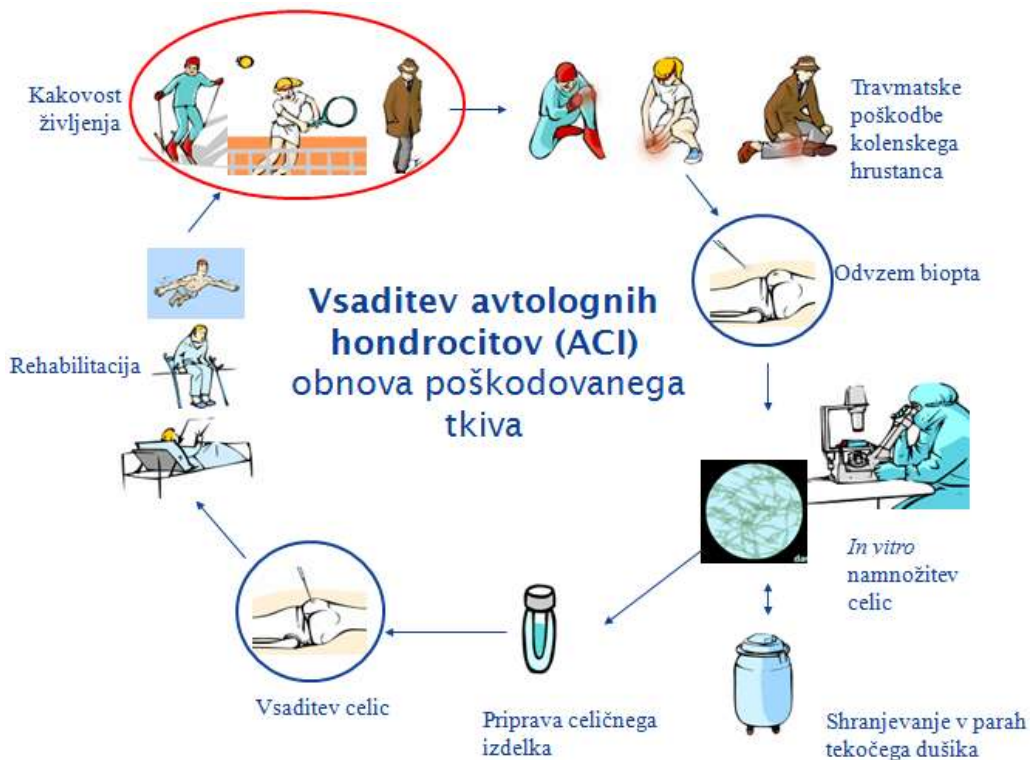
**Ključne besede:** *hrustanec, celične kulture, tkivno inženirstvo, implantacija avtoložnih hondrocitov, matične celice*

### Uvod

Regenerativni pristop pri zdravljenju stremi k obnovi poškodovanega ali okvarjenega tkiva, tako da vzpostavi strukturo tkiva, ki je čim bolj podobna tisti pri zdravem tkivu in s tem omogoči tudi ustrezno fiziološko funkcijo obnovljenega tkiva. Za doseg tega cilja različni tkivno-inženirski pristopi izbirajo med različnimi viri celic, biomateriali ter postopki za procesiranje celic in pripravo celičnega izdelka. Vsak od teh dejavnikov lahko bistveno vpliva na kvaliteto celičnega produkta in s tem na uspešnost zdravljenja, zato je izbira optimalnega postopka velik izziv pri tkivno-inženirskem razvoju.

Osnovni princip, ki se najpogosteje uporablja v klinični praksi za obnovo sklepnega hrustanca, je naslednji (Slika 1): kirurg v postopku artroskopske diagnostike, v katerem ugotovi ustrezno klinično indikacijo za zdravljenje s celicami, odvzame z neobremenjene sklepne površine delček hrustančnega tkiva. Biopt se prenese v laboratorij, kjer se aseptično obdeluje. Iz tkiva z encimsko razgradnjo izoliramo celice, te naselimo v gojilne posode, kjer se celice pritrdijo na podlago in začnejo podvojevati. Ko celice prerastejo površino gojilne posode, jih odstranimo s pomočjo encima tripsina in jih naselimo na večjo površino. Ta postopek lahko še ponavljamo, dokler ne dobimo zadostnega števila celic. Med postopkom gojenja lahko celice tudi shranimo po postopku krioprezervacije in s tem postopek gojenja prilagodimo datumu kirurškega posega. Namnožene celice pripravimo za

vsaditev: kot celično suspenzijo ali v kombinaciji z ustreznim nosilcem/materialom. Ker gre za avtologen celični izdelek, je potrebno pred sprostitvijo vsakega posameznega izdelka izvesti vse teste kontrole kakovosti.



Slika 1: Postopek zdravljenja z avtolognimi hrustančnimi celicami  
(Prirejeno po: Bonaca, Kregar Velikonja, 2007)

Cilj zdravljenja z avtolognimi hrustančnimi celicami je regeneracija tkiva, ki omogoči bolniki enako kvaliteto življenja, kot pred poškodbo. Za doseg tega cilja je potrebna priprava kakovostnega celičnega produkta, uspešno izveden kirurški postopek vsaditve celic ter ustrezna rehabilitacija.

Kot vir celic pa so za obnovo hrustančnega tkiva potencialno primerne tudi celice iz drugih hrustancev (npr. iz nosnega pretina ali ušesnega elastičnega hrustanca) ali mezenhimske matične celice (npr. iz kostnega mozga ali iz maščobnega tkiva). Z vidika tkivnega inženirstva je pri izbiri vira celic bistvenega pomena njihova sposobnost hondrogene diferenciacije oz. tvorbe hrustančne medceličnine.

## Metode

Za pripravo celičnega oz. tkivno-inženirskega produkta je potrebno celice izolirati iz hrustančnega tkiva, jih nasaditi v celični kulturi in namnožiti do ustreznega števila. Ker gre za avtologen celični produkt, je potrebno upoštevati interindividualno variabilnost in postopek gojenja prilagajati glede na rastno krivuljo posamezne celične kulture. Razvoj celičnega produkta za regeneracijo sklepnega hrustanca je sledil zlasti dvema ciljema:

- Zagotoviti ustrezno kakovost celic, da bodo po vsaditvi sposobne obnove hrustančnega tkiva (ustrezno živost in fenotip celic).
- Pripraviti celični produkt v obliki, ki bo omogočal čim enostavnejši in manj invazivni kirurški postopek ob vsaditvi.

Tekom razvoja smo tako preizkušali različne nosilne materiale in proučevali njihov vpliv na izražanje genov, ki nosijo zapis za osnovne gradnike hrustančne medceličnine. Analizirali smo zlasti izražanje kolagena tipa II in agrekana; predvsem v razmerju glede na kolagen tipa I in verzikan.

### **Teoretična izhodišča**

Uporaba avtolognih hrustančnih celic, namnoženih v laboratoriju, se je najprej začela uporabljati za namen obnove kolenskega sklepnega hrustanca (Brittberg s sod., 1994). Danes se ta pristop uporablja tudi za obnovo sklepnega hrustanca v gležnju (Whittaker s sod., 2005) in kolku (Akimau s sod., 2006).

Ko hrustančne celice namnožujemo v celični kulturi so te podvržene procesu dediferenciacije, vendar lahko z različnimi načini gojenja v tridimenzionalnem okolju ohranjamo celični fenotip in sferično obliko celic, ki omogoča sintezo za hrustanec značilne medceličnine (Barlič s sod., 2008; Awad s sod., 2004).

### **Alternativni viri celic za regeneracijo hrustanca**

Da bi se izognili nekaterim slabostim metode vsaditve avtolognih hondrocitov, kot so poškodovanje hrustančnega tkiva na mesto odvzema biopta, dediferenciaciji celic tekom gojenja in dvakratni kirurški obravnavi bolnika (ob odvzemu in ob vsaditvi celic) ter omejeni zmožnosti pomnoževanja hrustančnih celic (Marlovitz, 2006; Oldershaw, 2012), različni avtorji predlagajo uporabo alternativnih virov celic za obnovo hrustančnega tkiva. Uporabo predpripravljenih alogenskih hondrocitov v 3D alginatnem nosilcu so prvi predlagali Almquist s sod. (2007). Kljub uspešnim kliničnim rezultatom se metoda uporabe alogenskih celic ni širše uveljavila.

Drugo alternativo predstavljajo mezenhimske matične celice, ki se skozi klinične študije tudi že uvajajo v klinično uporabo (Filardo s sod., 2013). Mezenhimske matične celice najpogosteje pridobivamo iz kostnega mozga ali maščobnega tkiva in imajo zaradi svoje multipotentnosti potencial za uporabo v širokem spektru kliničnih indikacij (Pittinger s sod., 1999; Zuk s sod., 2001). Tehnološko omejitev glede uporabnosti mezenhimskih matičnih celic predstavlja interindividualna variabilnost tako z vidika proliferacije kot tudi z vidika diferenciacijske sposobnosti celic različnih dajalcev (Kregar Velikonja s sod., 2007)

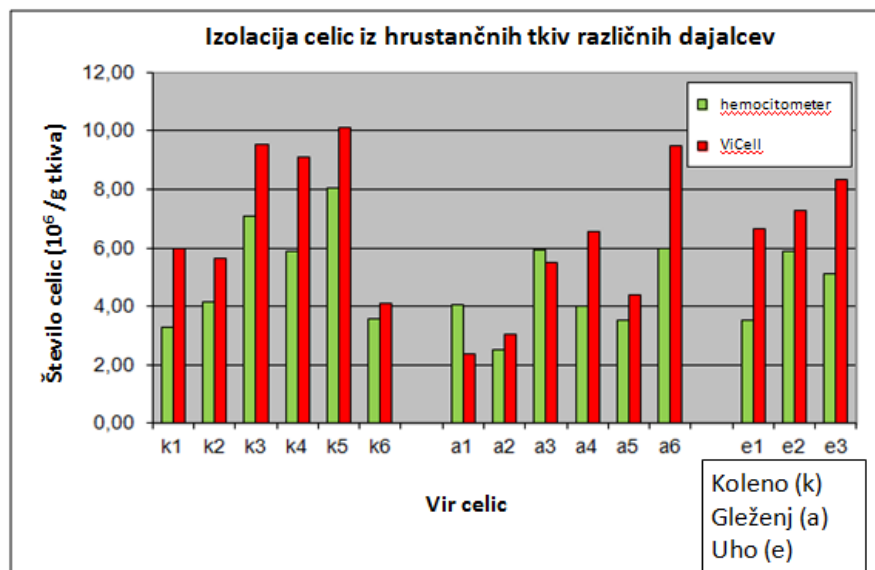
Ušesni hrustanec tudi predstavlja potencialno primeren vir celic zaradi razmeroma neinvazivnega postopka odvzema tkiva, protokoli gojene celice ušesnega hrustanca se že uporabljajo v kliničnih aplikacijah: za rekonstrukcije nosnega pretina (Yanaga s sod., 2006) in za zdravljenje vezikoureteralnega refluksa (Kmetec s sod., 2007). Celice elastičnega hrustanca in vitro imajo zelo podobne značilnosti kot celice sklepnega hrustanca, ohranjajo pa sintezo elastina, ki ni značilna komponenta medceličnine v sklepnem hrustancu (Maličev s sod., 2009) Pridobljeni so bili tudi neposredni dokazi o tem,

da celice po implantaciji tvorijo tkivo z obilno hrustančno medceličnino (Velikonja s sod., 2008).

## Pregled ugotovitev

### *Interindividualna variabilnost in njen pomen za gojenje hrustančnih celic*

Priprava celičnega produkta se začne z izolacijo celic iz hrustančnega tkiva. Že na tej stopnji se srečamo z veliko variabilnostjo med vzorci (Graf 1).

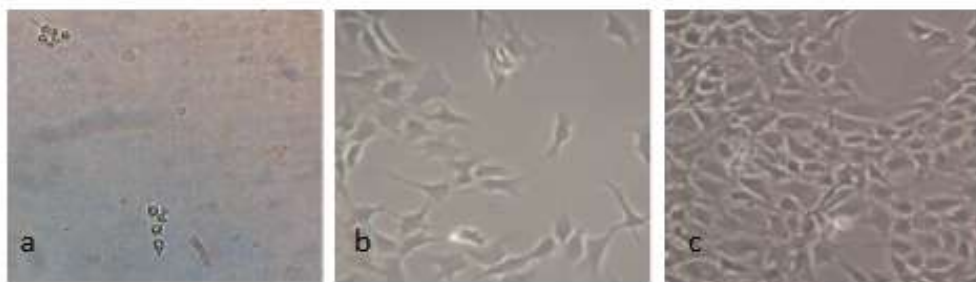


Graf 1: Izplen celic po izolaciji iz tkiva iz kolena, gležnja in ušesa pri različnih dajalcih (Vir: Educell)

Večje razlike v izplenu celic so med vzorci različnih dajalcev kot pa med hrustanci iz različnih delov telesa.

Masa bioptov variira od 50 do 400 mg, kar skupaj z variabilnim izplenom celic predstavlja zelo variabilno izhodišče za nadaljnji postopek gojenja celic in priprave celičnega produkta.

Pomnoževanje celic v povprečju traja 19 dni, od tega 13 dni v primarni kulturi in 6 dni v prvi pasaži. V primarni kulturi se morfologija celic spremeni iz sferične v fibroblastom podobno obliko (Slika 2).



Slika 2: Celice sklepnega hrustanca v primarni kulturi od naselitve do konfluentnosti:

a-dan 0, b- 7. dan, c-10. dan (vir: Educell)

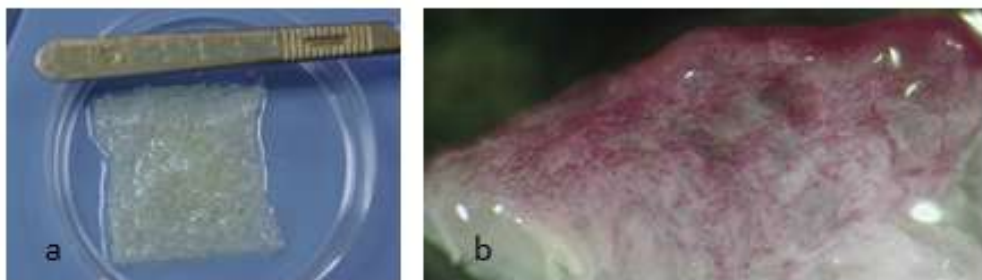
Zaradi procesa dediferenciacije celic ob pomnoževanju v celični kulturi, za implantacijo pripravljamo celice iz prvih pasaž. V večini primerov dobimo zadostno število celic za pripravo celičnega produkta po prvi pasaži.

S pomočjo različnih tridimenzionalnih gelskih nosilcev lahko dosežemo, da je morfologija celic sferična (kot je tudi v hrustančnem tkivu) (Slika 5b), hkrati pa dosežemo rediferenciacijo celic v smislu večjega izražanja genov, ki nosijo zapis za gradnike hrustančne medceličnine.

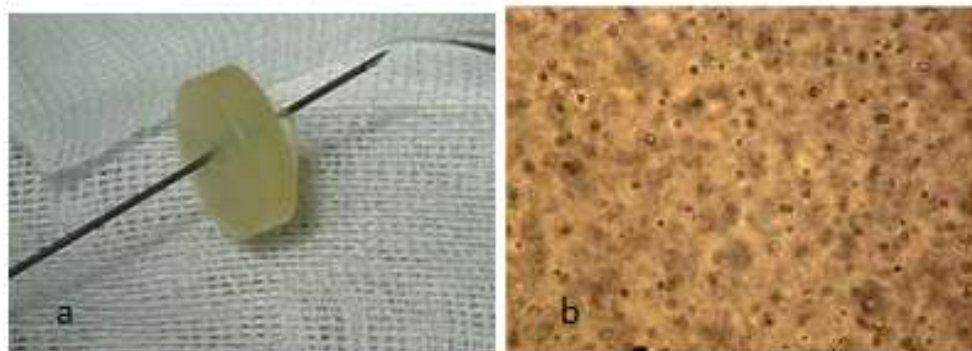
### ***Celični izdelki ChondroArt™***

Razvoj celičnega produkta za regeneracijo sklepnega hrustanca je rezultiral v treh generacijah produkta:

- ChondroArt™1D: suspenzija hrustančnih celic.
- ChondroArt™2D: celice na biorazgradljivem kolagenskem nosilcu (Slika 3). V primerjavi s celično suspenzijo ta produkt omogoča enostavnejšo vsaditev, saj so celice fiksirane na materialu. Ker celice površinsko preraščajo kolagenski nosilec je težko ovrednotiti število celic, ki se prirastejo in jih tako pripravimo za vsaditev. Da zagotovimo zadostno število celic na mestu poškodbe, običajno hkrati s tem produktom apliciramo še suspenzijo celic,.
- ChondroArt™3D: celice v alginat/agaroznem gelu (Slika 4).



Slika 3: Izdelek ChondroArt™2D: gojene hrustančne celice na biorazgradljivem kolagenskem nosilcu (a: makroskopski izgled, b: celice obarvane z MTT, lupa)  
(Vir: Educell)



Slika 4: Izdelek ChondroArt™3D: gojene hrustančne celice v alginat-agaroznem gelskem nosilcu (a: makroskopski izgled, b: Morfološki izgled in razporeditev celic v nosilcu, invertni mikroskop)  
(Vir: Educell)

Z razvojem izdelka ChondroArt™ 3D smo želeli doseči čim boljši fenotip celic, namenjenih za regeneracijo hrustanca. V celični kulturi namnožene celice smo naselili na različne 3D nosilce. Z analizo izražanja genov smo ugotavljali, kako različni materiali spodbujajo rediferenciacijo celic. V alginat-agaroznem nosilcu smo ugotovili najboljše izražanje genov za gradnike hrustančne medceličnine (kolagen tipa II in agrekan; v razmerju glede na kolagen tipa I in verzikan, ki ju začnejo proizvajati dediferencirane celice) (Barlič s sod., 2008). Izdelek omogoča tudi minimalno invaziven način vsaditve.

## Zaključek

Tekom razvoja smo se veliko ukvarjali s proučevanjem različnih virov celic s hondrogenim potencialom, vendar tehnologija ChondroArt™ še vedno temelji na celicah, izoliranih iz sklepnega hrustanca - predvsem zaradi postopka artroskopske diagnostike, ko kirurg istočasno odvzame biopt; vsak drug vir celic pa bi zahteval še dodaten kirurški poseg.

V klinični praksi se še vedno največ uporablja izdelek ChondroArt™ 2D.

ChondroArt™ 3D se opušča zaradi povečane pojavnosti otekanja sklepov po vsaditvi, saj nismo mogli izključiti možnosti, da je to reakcija na material. Ne glede na to pa rezultati razvoja ChondroArt™ 3D potrjujejo rediferencijsko sposobnost celic, ki jih gojimo po tehnologiji ChondroArt™. Celična suspenzija ChondroArt™ 1D se lahko uporablja tudi v kombinaciji z drugimi materiali, ki so namenjeni nadomeščanju poškodovanega hrustančnega tkiva z namenom, da se pospeši regeneracija tkiva.

Vsekakor je nadaljnji razvoj in nadgradnja obstoječe tehnologije osredotočena predvsem na iskanje ustrežnejšega nosilca, ki bo nadomestil sedanji 3D izdelek, hkrati pa bo primeren za uporabo pri širšem spektru kliničnih indikacij.

## Zahvala

Zahvala velja vsem bivšim in sedanjim sodelavcem, ki so prispevali k razvoju produktov za zdravljenje sklepnega hrustanca, zlasti Matjažu Jerasu, Elviri Maličev, Orjeti Bonaca, Saši Puhar, Danici Gantar in Dariji Huzimec ter kirurgom ortopedom, predvsem Damjanu Radosavljeviču in Mateju Drobniču, ki so z informacijami iz klinične prakse pomembno prispevali k usmerjanju razvoja novih produktov.

Razvoj in raziskave na področju celičnih produktov za obnovo sklepnega hrustanca je bil sofinanciran tudi s strani ARRS projektov R1—2979, L3—6011, L7—7598 ter raziskovalnega programa P3—0371.

## Literatura

1. [Akimau P, Bhosale A, Harrison PE, Roberts S, McCall IW, Richardson JB, Ashton BA.](#) Autologous chondrocyte implantation with bone grafting for osteochondral defect due to posttraumatic osteonecrosis of the hip--a case report. [Acta Orthop.](#) 2006 Apr;77(2):333-6.
2. Almqvist F, D'Hollander, Verdonk PC, Verdonk R, Verstraete KL, Verbruggen G. A prospective study of alginate seeded with mature allogenic human chondrocytes in the treatment of articular cartilage defects. *7th World Congress of the International Cartilage*

- Repair Society ICRS 2007*; 2007; Warsaw, Poland. International Cartilage Repair Society, Zurich. page 182.
3. Awad H.A., Wickham M.Q., Leddy H.A., Gimble J.M., Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 2004; 25: 3211-3222.
  4. [Barlic A, Drobnic M, Malicev E, Kregar-Velikonja N](#). Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation. *J Orthop Res*. 2008 Jun;26(6):847-53.
  5. Bonaca O, Kregar Velikonja N. In vitro chondrocyte cultivation and preparation of ChondroArt™ product for ACI. In: GORENŠEK, Miro (ur.), KREGAR-VELIKONJA, Nevenka (ur.). *Tissue engineering and cartilage repair : from basic science to clinical application*. Ljubljana: Educell: Cell and Tissue Engineering Society of Slovenia: Orthopaedic Clinic, Clinical Centre, 2007, str. 68-72.
  6. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889–95.
  7. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. [Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics](#). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Jan 11. [Epub ahead of print]
  8. Kmetec A, Bonaca O, Gorenšek M, Kregar Velikonja N. Treatment of vesicoureteral reflux by autologous chondrocyte implantation in kidney transplantation candidates. V: GORENŠEK, Miro (ur.), KREGAR-VELIKONJA, Nevenka (ur.). *Tissue engineering and cartilage repair : from basic science to clinical application*. Ljubljana: Educell: Cell and Tissue Engineering Society of Slovenia: Orthopaedic Clinic, Clinical Centre, 2007, str. 102-106.
  9. Kregar Velikonja N, Knežević M, Coer A, Jeras M. Characterisation of mesenchymal stem cells from adult bone marrow and their therapeutic potential. V: GORENŠEK, Miro (ur.), KREGAR-VELIKONJA, Nevenka (ur.). *Tissue engineering and cartilage repair : from basic science to clinical application*. Ljubljana: Educell: Cell and Tissue Engineering Society of Slovenia: Orthopaedic Clinic, Clinical Centre, 2007, str. 55-65.
  10. Malicev E, Kregar-Velikonja N, Barlic A, Alibegović A, Drobnic M. [Comparison of articular and auricular cartilage as a cell source for the autologous chondrocyte implantation](#). *J Orthop Res*. 2009 Jul;27(7):943-8. doi: 10.1002/jor.20833.
  11. Marlovits S, Trattnig S. Cartilage repair. *Eur J Radiol* 2006;57:1–2.
  12. [Oldershaw RA](#). Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol*. 2012 Dec;93(6):389-400. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00837.x. Epub 2012 Oct 18.
  13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
  14. Velikonja NK, Coer A, Gorensek M, Knezevic M, Kmetec A. Tissue formation following implantation of cultured elastic chondrocytes for treatment of vesicoureteral reflux. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:764–6.
  15. Whittaker JP, Smith G, Makwana N, Roberts S, Harrison PE, Laing P, Richardson JB. [Early results of autologous chondrocyte implantation in the talus](#). *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Feb;87(2):179-83. Erratum in: *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Jun;87(6):886.
  16. [Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohmori K](#). Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(6):2019-30; discussion 2031-2.
  17. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. [Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies](#). *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

## Zdravstvena nega bolnikov ob implantaciji hondrocitov

**Magda Peruško, dipl. m. s., Tanja Kuplenk, dipl. m. s.**

Univezitetni klinični center, Ljubljana; Ortopedska klinika  
Oddelek za artroskopijo in poškodbe pri športu  
magda.perusko@kclj.si; tanja.kuplenk@kclj.si

### Izvleček

V članku je opisana priprava bolnika na diagnostično artroskopijo sklepa, med katero je odvzet hrustanec za gojenje hondrocitov. Predstavljena je zdravstvena nega med pripravo in hospitalizacijo bolnika ob implantaciji hondrocitov.

Za bolnika in bolniku prijazno zdravstveno nego je pomembno timsko delo, kakovostno bivanje v bolnišnici. Vse skupaj pa je izrednega pomena za dober izid zdravljenja.

**Ključne besede:** *zdravstvena nega, bolnik, medicinska sestra*

### Uvod

Hrustanec je tkivo, ki se nahaja v sklepih in omogoča medsebojno drsenje dveh ali več kosti (Radosavljevič, Drobnič, 2002). Vzrok za poškodbe hrustanca so večinoma neposredni udarci na sklep oz. nastanejo posredno pri rotacijskih poškodbah sklepa. Delimo jih na poškodbe delne debeline (ni zajet celoten hrustanec), poškodbe celotne debeline (segajo do subhondralne kosti) ter osteohondralne poškodbe (segajo tudi v kost) (Drobnič et al., 2008).

Prva implantacija hondrocitov v Sloveniji je bila izvedena leta 1996 na Ortopedski kliniki, le dve leti po objavi prvih kliničnih rezultatov švedske skupine ortopedov (Radosavljevič et al., 2007).

Od leta 1996 do 2013 je bilo na Ortopedski kliniki operiranih 150 bolnikov. Skupaj z ostalimi bolnišnicami v Sloveniji je bilo operirano 210 bolnikov. Povprečna starost bolnikov ob operaciji je bila 27 let (Chondro baza).

V razpoložljivi domači in tuji literaturi nismo našli informacij o pooperativni zdravstveni negi po implantaciji hondrocitov. Uvedli smo svoj protokol, ki je skladen z drugimi standardi zdravstvene nege Ortopedske klinike.

### Pot bolnika ob implantaciji hondrocitov

#### Diagnostična obravnava bolnikov

Pot bolnika se začne s pregledom pri ortopedu. Običajne težave, ki jih bolniki navajajo so: bolečina v kolenu, otekanje sklepa in zaskoki kolena. Ortoped bolnika napoti na magnetno resonanco kolena. Glede na izvid preiskave bolniku predlaga nadaljnjo diagnostiko z artroskopijo. S tem se začne prvi bolnikov stik z Ortopedsko kliniko.

## **Priprave na diagnostično artroskopijo**

Ti bolniki so običajno aktivna populacija, zato jim s pravočasnim obveščanjem o datumu posega damo dovolj časa, da si uredijo vse v svojem življenjskem okolju (družina, služba). Pri tem skušamo upoštevati tudi njihove želje o terminu artroskopije. Hkrati z vabilom za poseg bolniku pošljemo vprašalnik o zdravstvenem stanju ter navodila za predpripravo na poseg v lokalni anesteziji. Predpriprava se začne že v domačem okolju bolnika. Pri osebнем zdravniku opravijo potrebne preiskave (laboratorijske preiskave krvi, elektrokardiogram, rentgen pljuč in srca).

Tako pride bolnik na dan posega na Ortopedsko kliniko že deloma pripravljen na poseg. Po administrativnem sprejemu, pregledu dokumentacije in izvidov, ga namestimo v bolniško sobo. Sprejemni zdravnik se z bolnikom pogovori o posegu ter odgovori na morebitna vprašanja. Bolnik podpiše soglasje za operativni poseg - artroskopijo. Prejme tudi informativno knjižico "Artroskopija kolena". Zelo pomembna je tudi podpisana izjava o poučenosti in soglasje bolnika za darovanje avtolognega kolenskega hrustanca in vsaditev gojenih avtolognih hrustančnih celic na nosilcu v sklep.

Po pripravi operativnega polja ter uvedbi intravenozne kanile, bolnika peljemo v operacijske prostore, kjer ga prevzame zdravstveni tehnik – mavčar, kateri bolnika pripravi za operativni poseg.

## **Diagnostična artroskopija**

Diagnostične artroskopije izvajamo v lokalni anesteziji. Poseg običajno traja 30 do 90 minut. Med artroskopijo se operater, glede na lego in velikost hrustančne poškodbe, odloči za odvzem hrustanca za gojenje hondrocitov (Artroskopija, 2010).

## **Pooperativni potek**

Bolnika po končanem posegu prepeljemo na oddelek. Ves čas operirani predel intenzivno hladimo. Bolnik prejema analgetična sredstva, občasno pa tudi infuzijske tekočine in dodatno antibiotično zaščito (Artroskopija, 2010). Posega in terapijo dokumentiramo na temperaturni list. Dodatne meritve zapisujemo na List spremljanja vitalnih funkcij.

Dan po posegu operativno rano previjemo. V primeru sklepnega izliva je potrebna punkcija sklepa.

K bolniku pridejo tudi zdravnik in medicinska sestra z Zavoda RS za transfuzijsko medicino. Bolniku odvzamejo 200 do 250 ml krvi za gojenje hondrocitov.

Mladoletnim bolnikom odvezamemo do deset epruvet krvi, ki jih odnesejo sodelavci iz laboratorija, kjer gojijo hondrocite.

Pred odhodom domov bolnik prejme pisna navodila za nadaljevanje zdravljenja.

S tem je zaključena prva faza priprav na implantacijo hondrocitov.

## **Priprave na operacijo - vstavev hondrocitov**

Po treh tednih gojenja v laboratoriju so hondrociti pripravljani za vsaditev v sklep (Drobnič et al., 2005).

V primerjavi z artroskopijo kolena je vsaditev hondrocitov obsežnejši poseg. Bolnika pripravimo za poseg v spinalni ali splošni anesteziji. Ker so to večinoma mlajši bolniki, jih naročimo za priprave dan pred posegom. Pregledamo izvide, bolnik podpiše privolitev za operacijo in anestezijo. Če je potrebno opravi dodatna slikanja. Izmerimo mu vitalne funkcije, pregledamo kožo na operativnem polju in o posebnostih obvestimo ortopeda. Pogovorimo se o režimu prehranjevanja, pitja tekočin in odvajanja na ta dan (svečke, sirup, tablete). Nato bolnika do naslednjega dne pošljemo v njegovo domače okolje (Standard, 2011).

Bolnikovo dokumentacijo predstavimo anesteziistu, kateri določi vrsto premedikacije, ki jo bo bolnik prejel na oddelku naslednji dan pred odhodom v operacijski blok. Običajno dobi bolnik pred posegom midazolam.

Bolnik se vrne na Ortopedsko kliniko na dan posega zjutraj, kjer se odvija neposredna priprava na operativni poseg. Po urejenih formalnostih, bolnika pospremimo do bolniške sobe. Pri viziti ortoped označi prizadeto okončino. Bolnik se mora 30 minut pred operacijo stuširati z raztopino za higiensko in kirurško razkuževanje kože (Lifo-Scrub). Sledi priprava označenega operativnega polja z antiseptičnim razkužilom CITROclorex 2% red, Nato bolnika odpeljemo v operacijske prostore in ga predamo zdravstvenemu tehniku – mavčarju, anestezijski medicinski sestri in anesteziologu.

## **Operacija - vstavev hondrocitov**

Pred posegom v operacijski sobi dobi bolnik prvi odmerek antibiotika (Cefazolin). Tega prejeme po operaciji še trikrat v enoti intenzivne nege oziroma na oddelku.

Operacija traja eno do dve uri, nato bolnika premestimo v prebujevalnico. Ko se popolnoma prebudi ga premestimo v enoto intenzivne terapije Ortopedske klinike. Tu dobiva analgezijo po navodilu anesteziologa. Najpogosteje je to morfinski preparat (Dipidolor) preko infuzijske črpalke. Bolnik ne sme dobiti nesteroidnih antirevmatikov, ker zavirajo vraščanje hondrocitov. Vitalne funkcije mu merimo vsako uro oziroma večkrat, če je potrebno. Opazujemo operirani sklep (otekanje), drenažo iz rane (količina izliva v sukcijski steklenici) in občutenje ter gibanje spodnjih okončin zaradi spinalnega bloka. Takoj se začne tudi fizioterapija po protokolu. Koleno intenzivno hladimo.

## **Pooperativni potek**

Dan po operaciji prevezemo rano na mestu operacije in odstranimo sukcijsko cevko iz sklepa. Med prevezo opazujemo operativno rano, oteklino, okolico rane in izliv v sukcijski steklenici. Vse zabeležimo na temperaturni list. O posebnostih obvestimo zdravnika

Bolnika premestimo nazaj na oddelek, kjer nadaljujemo z opazovanjem operiranega sklepa, rane in bolnikovega splošnega stanja. Vitalne znake merimo na dve do tri ure.

Po operaciji dobiva bolnik nizkomolekularne heparine. Če jih dobiva v obliki podkožnih injekcij, ga tekom hospitalizacije naučimo aplikacije le teh.

V naslednjih dneh prevezujemo rano vsak drugi dan oz. po potrebi. Sodelujemo pri morebitnih punkcijah kolena, ki so po operaciji lahko pogoste in pomenijo olajšanje za bolnika, vendar pa lahko pomenijo tudi morebitni vnos bakterij v sklep. Vsaj enkrat po operaciji opravimo laboratorijske preiskave krvi.

Bolnika odpustimo domov sedmi dan po operaciji z odpustnico, recepti za analgetike in antikoagulantno terapijo.

## **Zaključek**

Potek zdravljenja in zdravstvena nega bolnika z implantacijo hondrocitov se je z leti izboljšala. Leta 1996 je hospitalizacija trajala od 14 do 21 dni. Bolnik je po operaciji lahko vstajal šele po tretjem dnevu. Njegova samooskrba je bila slaba. Operiran sklep je nekaj dni po operaciji zelo otekal. Danes traja hospitalizacija bolnika sedem dni po operaciji. Bolnik vstane takoj naslednji dan po operaciji. Stopnja samooskrbe bolnika je visoka.

Na Ortopedski kliniki se zavzemamo za timsko delo in bolniku prijazno zdravstveno nego. V ta namen imamo pripravljene številne zloženske in knjižice, ki so lahko bolniku v pomoč pri razjasnitvi vprašanj in pripravi na operacijo. Za dodatna vprašanja je zdravstveno osebje bolnikom dosegljivo po elektronski pošti, po telefonu v času govorilnih ur in osebno v času priprav na operacijo.

Vloga medicinske sestre v zdravstvenem timu pri implantaciji hondrocitov je izrednega pomena. Medicinska sestra skrbi za nemoten potek predoperativne priprave bolnika. Pooperativna zdravstvena nega pa vključuje predvsem podporo bolniku pri zagotavljanju osnovnih življenjskih aktivnosti.

Prizadevamo si, da so bolniki zadovoljni z našimi storitvami in se čim hitreje vrnejo v svoje domače okolje .

## **Literatura:**

1. Radosavljevič D, Drobnič M. Poškodbe hrustanca. XX. Ortopedski dnevi. Poškodbe pri športu, Ljubljana, 15.-16.2002. Ljubljana: Ortopedska klinika, klinični center, 2002.
2. Drobnič M, Zupanc O, Stražar K, Radosavljevič D. Sodobni načini zdravljenja sklepnega hrustanca. XXV. Ortopedski dnevi. Novosti v ortopediji, Ljubljana 11.-12.4.2008. Ljubljana: Ortopedska klinika, Klinični center, 2008.
3. Radosavljevič D, Drobnič M, Koritnik B, Gorenšek M, Pavlovčič V. Autologous chondrocyte implantation in the knee - 10 years of clinical experience. Tissue engineering and cartilage repair: from basic science to clinical application / editors Gorenšek M and Kregar Velikonja N. Ljubljana: Educell, 2007.
4. Artroskopija kolena: Informacije za bolnike. Ljubljana: Ortopedska klinika Ljubljana, 2010.
5. Drobnič M, Radosavljevič D, Kregar Velikonja N. Vsaditev avtolognih gojenih hondrocitov. Ljubljana: Klinični center Ljubljana, 2005.
6. Standard zdravstvene nege: Priprava pacienta na operacijo. Ljubljana: Ortopedska klinika Ljubljana, 2011.
7. Register slovenskih bolnikov z avtolognimi gojenimi hondrociti.

**NAPREDNO ZDRAVLJENJE S TKIVI  
V OČESNI KIRURGIJI**



## Priprava amnijske membrane za zdravljenje

**dr. Tina Cirman, univ. dipl. biol.<sup>1</sup>**  
**izr. prof. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
Laboratorij za celično biologijo  
tina.cirman@ztm.si

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

### Izvleček

Amnijska membrana (AM) je večplastni, notranji del placente. Zaradi lastnosti, ki izvirajo iz njene biološke zgradbe, se veliko uporablja v očesni kirurgiji: pospešuje epitelizacijo, ima protimikrobni učinek, deluje protivnetno, zavira brazgotinjenje tkiva in angiogenezo. Kljub razširjeni uporabi in številnim člankom, ki pričajo o njeni uspešnosti v očesni kirurgiji, ostaja uporaba AM ena najmanj standardiziranih metod v oftalmologiji. Zaradi velikih razlik v pridobivanju in obdelavi AM, izbiri pacientov, operacijskih indikacijah in tehnikah je skoraj nemogoče primerjati različne metode ter njihove rezultate med seboj. Zdravljenje z AM v Sloveniji od leta 2000 izvaja Očesna klinika Univerzitenega kliničnega centra v Ljubljani, obdelava in shranjevanje AM pa poteka na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM).

**Ključne besede:** *amnijska membrana, epitelizacija, nosilec, očesna kirurgija, pluripotentne matične celice, krioprezervacija*

### Uvod

Človeška AM je notranja plodova ovojnica [1] in ima pomembno vlogo pri zagotavljanju homeostaze amnijske tekočine [2]. AM je debela 0,02–0,5 mm in je sestavljena iz več plasti [3]: enojna, metabolično aktivna epiteljska plast (a) je pritrjena na bazalno lamino (b), sestavljeno iz mreže kolagenskih vlaken, integrinov in proteoglikanov. Apikalna površina epiteljskih celic je oblikovana v mikrovile. Brezcelična kompaktna plast (c) je najmočnejša plast AM, sestavljena iz številnih vzporedno nameščenih kolagenskih vlaken. Sledi fibroblastna plast (d), ki je najdebelejša plast AM in v kateri fibroblasti kolagen sintetizirajo. Gobasta plast (e) meji na horion, zunanji del placente.

Integriteto AM vzdržujejo (1) citoskeletni proteini epiteljskih in stromalnih celic, kot so aktin, tubulin, različni citokeratini, vimentin, dezmin [4]; (2) stični proteini med epiteljskimi celicami AM, npr. okcludin, klavdin-3 in -4 in dezmozoplakin [5] ter (3) različni tipi kolagena (I, III, IV, V, VI)

Epitelij AM je vir številnih ravnih dejavnikov. V AM, ki je bila shranjena en mesec pri –80 °C, so dokazali prisotnost epidermalnega ravnega dejavnika (EGF), transformirajočega ravnega dejavnika- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), ravnega dejavnika keratinocitov (KGF), hepatocitnega ravnega dejavnika (HGF), receptorja za hepatocitni ravnega dejavnika (HGFR), bazični fibroblastni ravnega dejavnika (bFGF) ter transformirajoča ravnega dejavnika (TGF)- $\beta$ 1 in - $\beta$ 2 [7]. Ti ravnega dejavniki najverjetneje sodelujejo pri pospeševanju reepitelizacije roženice in

zmanjšujejo njeno brazgotinjenje ter vnetje [1]. Epitelij AM je tudi vir endotelina-1 [8] ter levkotrienov [9].

Mnenja o tem, ali se na celicah AM nahajajo antigeni poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (angl. *human leukocyte antigen*, HLA) -A, -B, -C in -DR, si nasprotujejo. Nekateri avtorji navajajo, da se ti antigeni izražajo [10], medtem ko drugi menijo drugače [11]. Druga možnost se zdi verjetnejša, saj po presaditvi človeških epiteljskih celic AM ni prišlo do akutne imunske zavrnitve tkiva [11]. Ker večjega imunskega odziva niso opazili niti pri ksenotransplantaciji človeške AM v oči podgan, avtorji menijo, da je človeška AM imunsko privilegirano tkivo [12].

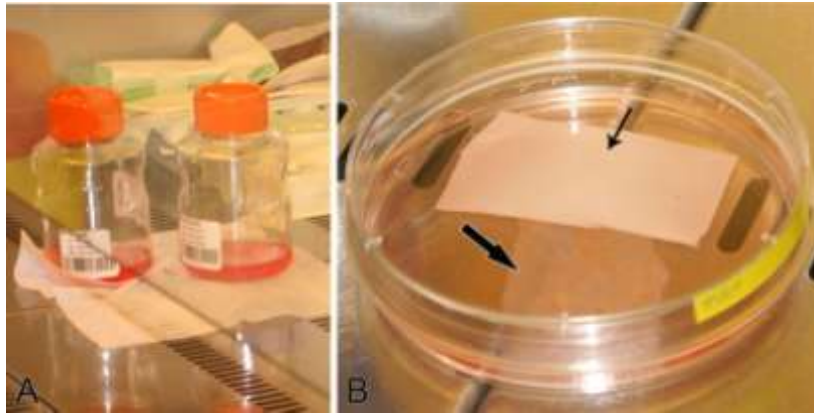
Zaradi njenih bioloških značilnosti AM uspešno uporabljajo na različnih področjih [1]. Prvo poročilo o terapevtski uporabi AM je iz leta 1910, ko je Davis uporabil svežo AM pri zdravljenju kroničnih kožnih ran, nastalih zaradi opeklin [13]. V 40-ih letih 20. stoletja sta de Rotth [14] in Sorsby [15] uporabljala AM za popravilo očesnih opeklin (angl. *ocular burns*). Po 2. svetovni vojni je – sodeč po literaturi – uporaba AM močno upadla vse do 90. let prejšnjega stoletja, ko sta Battle in Paderno uporabila AM kot nadomestek veznice [16]. Uporaba AM v očesni kirurgiji je narastla po letu 1995, ko sta Kim in Tseng objavila poročilo o uporabi v glicerolu shranjene človeške AM za rekonstrukcijo poškodovane zajčje roženice [17]. Zdaj AM uporabljajo za različne oftalmološke indikacije (*glej prispevek M. Beltram – v tej publikaciji*).

Pozitivni učinki AM so posledica njenih bioloških lastnosti. AM pospešuje epitelizacijo, preprečuje vnetje, angiogenezo in brazgotinjenje; služi lahko kot substrat za celično rast, ima antimikrobni učinek ter deluje kot biološka obveza [2]. Bolniki po presaditvi AM čutijo manjšo bolečino. AM tudi pospešuje diferenciacijo celic in vzdržuje normalno morfologijo epiteljskih celic [18], preprečuje apoptozo [19] in pospešuje adhezijo različnih tipov celic, npr. epitelija roženice [20].

Največja pomanjkljivost uporabe krioprezervirane AM je, da proces izbire darovalke, odvzema tkiva, njegove priprave ter načina shranjevanja ni standardiziran. Znano je, da se biokemijska sestava ter histološki videz AM spreminjata skozi nosečnost. Debelina in prosojnost AM je na različnih mestih različna, prav tako vsebnost proteinov. Raven rastnih dejavnikov v AM je odvisna od gestacijske starosti ter starosti darovalke AM [2]. Znano je tudi, da na učinkovitost AM kot substrata za gojenje celic vpliva dolžina ter način shranjevanja in verjetno tudi način uporabe (sveža – konzervirana) AM [21].

### **Priprava in shranjevanje AM**

V preteklosti so uporabljali različne metode priprave in shranjevanja AM, npr. sušenje na zraku, obdelava z glutaraldehidom in politetrafluoroetilenom ter liofilizacija. Zdaj za obdelavo in shranjevanje AM največ uporabljamo (a) krioprezervacijo sveže očiščene AM pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bodisi v fosfatnem pufri z NaCl (PBS), ki mu dodamo dimetil sulfoksid bodisi v gojišču MEM, ki mu dodamo glicerol (Slika 1A) ali liofilizacijo AM (Slika 1B). Obdelava AM mora potekati v aseptičnih razmerah, antibiotike pa je treba dodati v vse raztopine, ki se uporabljajo med obdelavo AM. Kot metodi sterilizacije in prezervacije se uporabljata tudi sterilizacija AM z  $\gamma$ -obsevanjem in s pankreatinom in shranjevanje v trehalozi [1].



Slika 1: (A) Priprava AM za shranjevanje pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . AM je v mešanici gojišča MEM in glicerola (1:1). (B) AM (debela puščica) in nitrocelulozna membrana, na katero je bila položena AM med krioprezervacijo. Vir: M. Erdani Kreft

Predvsem v zahodnem svetu zakonodaja zahteva zagotavljanje HIV negativnih donorjev. Kri darovalke AM je zato treba testirati na virusne markerje, v nekaterih primerih pa to pomeni tudi polletno karanteno obdelane AM. Sveže tkivo se zato le redko uporablja [2], čeprav obstajajo poročila tudi o tem [22]. Še posebej je to pogosto v državah v razvoju, kjer veliki in dragi zamrzovalniki niso dostopni [23]. Kljub temu da različni načini obdelave, shranjevanja in sterilizacije AM vplivajo na njene lastnosti, nekateri rezultati kažejo, da ni razlik v kliničnih rezultatih, kadar je uporabljena sveža ali zamrznjena AM [24]. Ker AM ostane terapevtsko aktivna kljub temu, da epitelijske celice AM med krioprezervacijo odmrejo, je možno, da AM deluje kot matriks za razraščanje funkcionalnih celic, ne pa njihov vir [25]. Terapevtski učinek so pripisali tudi ravnim dejavnikom, ki ostanejo v shranjeni AM [7].

### AM kot vir pluripotentnih matičnih celic

Embrionalno nastajajo epitelijske celice AM iz ektoderma in mezenhimske celice AM iz endoderma. Zaradi izredne plastičnosti in imunoloških lastnosti so postale celice AM zanimive za številne predklinične raziskave, saj naj bi bile pomemben vir matičnih celic in uporabne za zdravljenje oftalmoloških kot tudi številnih drugih bolezni (nevroloških, mišičnih, žilnih, pankreasnih) [26].

Bilic in sod. [27] so optimizirali protokol izolacije in gojenja celic AM in ugotovili, da je v 1 g AM  $6,3 \times 10^6$  amnijskih epitelijskih celic in  $1,7 \times 10^6$  amnijskih mezenhimskih celic. Med temi celicami so tudi matične celice, ki so jih v razmerah *in vitro* vzdrževali od celične pasaže P0 do P4 [28]. Matične celice AM vsebujejo specifične označevalce mezenhimskih matičnih celic (CD90, CD44, CD73, CD166, CD105, CD29) in označevalce embrionalnih matičnih celic SSEA-3 in -4 ter STRO-1 [27], [28]. Amnijske epitelijske matične celice izražajo tudi Oct-4 and Nanog, transkripcijska dejavnika, ki sta nujna za samoobnovo in pluripotentnost [29], [30]. Na podlagi imunohistokemijskih in genetskih analiz je bilo tako dokazano, da so amnijske epitelijske matične celice pluripotentne, kar pomeni, da se iz njih lahko razvijejo celice vseh treh zarodnih plasti. Iz njih so v razmerah *in vitro* že razvili endodermalne celice jeter in trebušne slinavke, mezodermalne srčnomišične celice ter ektodermalne živčne celice [31]. Amnijske matične celice imajo tudi pomembne prednosti v primerjavi z embrionalnimi matičnimi celicami, saj za razliko od embrionalnih matičnih celic ne izražajo telomerase in niso tumorogene. Z

nadaljnimi raziskavami se bodo verjetno protokoli za izolacijo, proliferacijo in diferenciacijo amnijskih matičnih celic v ustrezne tipe celic še izpolnjevali. Glede na to, da sta pridobivanje in uporaba amnijskih matičnih celic etično sprejemljivejša od pridobivanja in uporabe embrionalnih matičnih celic, pričakujemo, da bodo v prihodnosti amnijske matične celice pomemben vir celic za zdravljenje poškodovanih ali bolezenskih tkiv.

### **Uporaba AM v Sloveniji**

V Sloveniji obdelavo, shranjevanje in testiranje AM izvaja ZTM, zdravljenje z AM pa poteka na Očesni kliniki UKC Ljubljana. Obdelava in shranjevanje potekata po metodi, ki sta jo opisala Lee in Tseng [32].

Ker je ob vaginalnem porodu večja verjetnost, da pride do bakterijske kontaminacije AM [33], se odvzem AM izvede samo pri porodih z elektivnim carskim rezom. Identifikacijo darovalke, pridobitev soglasja ter odvzem AM izvede osebje Očesne klinike, ki v največ eni uri po odvzemu na ZTM dostavi AM, fiksirano na nitrocelulozno membrano ter shranjeno v raztopini MEM z gentamicinom (Slika 1A). AM prenesemo v čiste prostore, kjer v aseptičnih razmerah AM razrežemo na manjše koščke ter shranimo v shranjevalnem gojišču (50-odstotni glicerol – 50-odstotni MEM z gentamicinom). Odvzamemo tudi vzorce za določanje bakteriološke ustreznosti gojišča ter koščkov AM, kot za oftalmološke pripravke določa evropska *Pharmacopoeia*. AM shranimo pri  $-80^{\circ}\text{C}$  v karanteni.

Skupaj z AM na ZTM sprejmemo tudi vzorec krvi darovalke, ki ga biološko testiramo, kot določa zakonodaja (za HIV, hepatitis B in C, sifilis; opravimo serološke teste ter NAT – tehniko ojačanja nukleinske kisline). Uporaba NAT občutno skrajša diagnostično okno [34], zato šestmesečna karantena in ponovno testiranje darovalke na HIV nista potrebna. Po prejetih ustreznih rezultatih bioloških testov ter bakterioloških kontrol AM sprostimo v uporabo. Če rezultati kakšnega od testov niso ustrezni, testiranje ponovimo z duplikati vzorcev. Če rezultati ponovno odstopajo, AM uničimo. AM shranjujemo pri  $-80^{\circ}\text{C}$  največ 2 leti, naročnikom pa jo izdajamo po potrebi.

Obdelava AM poteka v laboratoriju, ki izpolnjuje zahteve dobre proizvodne prakse (*good manufacturing practice*, GMP) in pravilih, ki jih določa *Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje* (Ur. l. RS, št. 61/2007). Vsi reagenti, ki jih uporabljamo pri obdelavi in shranjevanju AM, imajo certifikat CE (*European Conformity*). Za celoten postopek pridobivanja, obdelave, shranjevanja in uporabe AM sta ZTM in Očesna klinika pridobili dovoljenje Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke.

### **Zaključek**

Zaradi svojih bioloških lastnosti se AM veliko uporablja v očesni kirurgiji: krioprezervirana ali sveža AM je vir številnih rastnih dejavnikov, ki pospešujejo reepitelizacijo roženice, zmanjšujejo njeno brazgotinjenje ter vnetje. AM je tudi vir matičnih celic, ki bi jih lahko v prihodnosti uporabljali za zdravljenje oftalmoloških in drugih bolezni.

## Literatura

- [1] A. K. Riau, R. W. Beuerman, L. S. Lim, and J. S. Mehta, "Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 2, pp. 216–25, 2010.
- [2] T. Reinhard and D. F. P. Larkin, *ESSENTIALS IN OPHTHALMOLOGY: Cornea and External Eye Disease*. Springer, 2006.
- [3] G. Bourne, "The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function.," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 38, pp. 193–201, 1962.
- [4] C. Ockleford, T. Malak, A. Hubbard, K. Bracken, S. a Burton, N. Bright, G. Blakey, J. Goodliffe, D. Garrod, and C. D'Lacey, "Confocal and conventional immunofluorescence and ultrastructural localisation of intracellular strength-giving components of human amniochorion.," *Journal of anatomy*, vol. 183 ( Pt 3, pp. 483–505, Dec. 1993.
- [5] A. Beham, H. Denk, and G. Desoye, "The distribution of intermediate filament proteins, actin and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies.," *Placenta*, vol. 9, no. 5, pp. 479–92.
- [6] M. E. Kreft and U. Dragin, "Amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine," *Zdrav Vestn*, vol. 79, pp. 707–15, 2010.
- [7] N. J. Koizumi, T. J. Inatomi, C. J. Sotozono, N. J. Fullwood, A. J. Quantock, and S. Kinoshita, "Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane.," *Current eye research*, vol. 20, no. 3, pp. 173–7, Mar. 2000.
- [8] M. L. Casey, R. A. Word, and P. C. MacDonald, "Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. Potential source of amniotic fluid endothelin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 266, no. 9, pp. 5762–8, Mar. 1991.
- [9] M. C. Rees, V. Di Marzo, A. Lopez Bernal, J. R. Tippins, H. R. Morris, and A. C. Trunbull, "Leukotriene release by human fetal membranes, placenta and decidua in relation to parturition.," *The Journal of endocrinology*, vol. 118, no. 3, pp. 497–500, Sep. 1988.
- [10] A. Hammer, H. Hutter, A. Blaschitz, W. Mahnert, M. Hartmann, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, and G. Dohr, "Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G.," *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, vol. 37, no. 2, pp. 161–71, Feb. 1997.
- [11] C. A. Akle, M. Adinolfi, K. I. Welsh, S. Leibowitz, and I. McColl, "Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers.," *Lancet*, vol. 2, no. 8254, pp. 1003–5, Nov. 1981.
- [12] M. Kubo, Y. Sonoda, R. Muramatsu, and M. Usui, "Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation.," *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 42, no. 7, pp. 1539–46, Jun. 2001.
- [13] J. Davis, "Skin transplantation. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital," *JHH Report*, vol. 15, pp. 307–96, 1910.
- [14] A. de ROTTH, "PLASTIC REPAIR OF CONJUNCTIVAL DEFECTS WITH FETAL MEMBRANES," *Archives of Ophthalmology*, vol. 23, no. 3, pp. 522–525, Mar. 1940.
- [15] A. Sorsby and H. M. Symons, "Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree).," *The British journal of ophthalmology*, vol. 30, pp. 337–45, Jun. 1946.
- [16] H. S. Dua, J. A. P. Gomes, A. J. King, and V. S. Maharajan, "The amniotic membrane in ophthalmology.," *Survey of Ophthalmology*, vol. 19, no. 1, pp. 51–77, 2004.
- [17] J. C. Kim and S. C. G. Tseng, "Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas.," *Cornea*, vol. 14, no. 5, pp. 473–484, 1995.
- [18] D. Meller and S. C. Tseng, "Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane.," *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 40, no. 5, pp. 878–86, Apr. 1999.
- [19] N. Boudreau, Z. Werb, and M. J. Bissell, "Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle.,"

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 8, pp. 3509–13, Apr. 1996.
- [20] A. A. Khodadoust, A. M. Silverstein, D. R. Kenyon, and J. E. Dowling, “Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane.,” *American Journal of Ophthalmology*, vol. 65, no. 3, pp. 339–48, 1968.
- [21] A. J. Shortt, G. A. Secker, R. J. Lomas, S. P. Wilshaw, J. N. Kearney, S. J. Tuft, and J. T. Daniels, “The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells.,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 6, pp. 1056–65, Feb. 2009.
- [22] L. F. Mejía, C. Acosta, and J. P. Santamaría, “Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface.,” *Cornea*, vol. 19, no. 3, pp. 288–91, May 2000.
- [23] T. Nakamura, “Sterilized, Freeze-Dried Amniotic Membrane: A Useful Substrate for Ocular Surface Reconstruction.,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 45, no. 1, pp. 93–99, Jan. 2004.
- [24] P. J. Addis, C. J. Hunt, and J. K. G. Dart, “Amniotic membrane grafts, ‘fresh’ or frozen? A clinical and in vitro comparison.,” *British Journal of Ophthalmology*, vol. 85, no. 8, pp. 905–7, 2001.
- [25] F. E. Kruse, a M. Jousseaume, K. Rohrschneider, L. You, B. Sinn, J. Baumann, and H. E. Völcker, “Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction.,” *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, vol. 238, no. 1, pp. 68–75, Jan. 2000.
- [26] O. Parolini and M. Caruso, “Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update.,” *Placenta*, vol. 32 Suppl 2, pp. S186–95, 2011.
- [27] G. Bilic, S. M. Zeisberger, A. S. Mallik, R. Zimmermann, and A. H. Zisch, “Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy.,” *Cell transplantation*, vol. 17, no. 8, pp. 955–68, Jan. 2008.
- [28] S. Díaz-Prado, E. Muiños-López, T. Hermida-Gómez, M. E. Rendal-Vázquez, I. Fuentes-Boquete, F. J. de Toro, and F. J. Blanco, “Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane.,” *Journal of cellular biochemistry*, vol. 111, no. 4, pp. 846–57, Nov. 2010.
- [29] H. Niwa, S. Masui, I. Chambers, A. G. Smith, and J. Miyazaki, “Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells.,” *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 5, pp. 1526–36, Mar. 2002.
- [30] I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith, “Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.,” *Cell*, vol. 113, no. 5, pp. 643–55, May 2003.
- [31] T. Miki, T. Lehmann, H. Cai, D. B. Stolz, and S. C. Strom, “Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells.,” *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 23, no. 10, pp. 1549–59, 2005.
- [32] S.-H. Lee and S. C. G. Tseng, “Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration.,” *American Journal of Ophthalmology*, vol. 123, no. 3, pp. 303–312, 1997.
- [33] H. N. Madhavan, K. Priya, J. Malathi, and P. R. Joseph, “Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction.,” *Indian journal of ophthalmology*, vol. 50, no. 3, pp. 227–31, Sep. 2002.
- [34] J. Weusten, M. Vermeulen, H. van Drimmelen, and N. Lelie, “Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms.,” *Transfusion*, vol. 51, no. 1, pp. 203–15, Jan. 2011.

## Zdravljenje z amnijsko membrano v očesni kirurgiji

asist. mag. Matej Beltram, dr.med.

Univerzitetni klinični center, Ljubljana; Očesna klinika  
matej\_beltram@yahoo.com

### Izvleček

Prvi opisi uporabe amnijske membrane (AM) v očesni kirurgiji segajo v 40. leta 20. stoletja. Pravi razmah uporabe je prisoten zadnjih 20 let. Na Očesni kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (OK UKCL) uporabljamo sterilno odvzeto in pripravljeno AM po protokolu Zavoda RS za transfuzijsko medicino (ZTM) in OK UKCL. Glavne indikacije za uporabo AM v očesni kirurgiji so zdravljenje bolezni in poškodb očesne površine, t.j. veznice in roženice. Presadek AM tako uporabljamo za zdravljenje brazgotin in zarastlin veznice, sindroma Stevens-Johnson, pterigija ter za rekonstrukcijo veznične površine. Pri tem AM služi kot podlaga za rast epitela. AM uporabljamo kot obliž v primerih okvare površine roženice, kot so: kemične poškodbe, pomanjkanje limbalnih zarodnih celic roženice, trajni defekti epitela roženice, bulozna keratopatija ter razjede roženice. AM je odlična podlaga za gojenje limbalnih zarodnih celic *ex vivo*.

AM uporabljamo v očesni kirurgiji zaradi njenih posebnih lastnosti: preprečuje brazgotinjenje in vaskularizacijo tkiva, pospešuje reepitelizacijo in celjenje ran ter deluje protimikrobno in protivnetno. Te lastnosti so verjetno pogojene z veliko vsebnostjo citokinov, rastnih faktorjev in inhibitorjev proteaz v AM ter z njenimi anti-imunogenimi lastnostmi.

**Ključne besede:** *amnijska membrana, očesna kirurgija, bolezni očesne površine, sindrom Stevens-Johnson, pomanjkanje limbalnih celic, roženična razjeda, kemične poškodbe očesa.*

### Uvod

AM so prvič uporabili pred več kot sto leti za prekrivanje ran in kožnih opeklin (Davis, 1910) zaradi njenih lastnosti, da preprečuje brazgotinjenje in nastajanje zarastlin, da pospešuje epitelizacijo in da deluje protimikrobno in protivnetno. Prva omemba uporabe v očesni kirurgiji sega v leto 1940, ko so uporabili svežo AM za rekonstrukcijo veznične površine (De Roth, 1940). Nekaj let kasneje so jo prvič uporabili kot obliž (angl. *patch*) pri zdravljenju opeklin očesne površine (Sorsby et al., 1946, 1947). Nato je uporaba amnijske membrane v očesni kirurgiji utonila v pozabo za več desetletij, vsaj v zahodnem svetu. Medtem so na področju nekdanje Sovjetske zveze (SZ) razvijali številna nadomestna tkiva in materiale za uporabo v rekonstruktivni kirurgiji, med njimi tudi AM. Razvili so liofilizirano AM za uporabo v očesni kirurgiji, vendar je bil izvoz na zahod prepovedan in njena uporaba izven SZ ni bila razširjena (Dua et al., 2004). Po spletu naključij sta Battle in Perdomo (1992) ter nato Kim in Tseng (1995) ponovno odkrila uporabnost AM v očesni kirurgiji in razširila njeno uporabo tudi na zahodu. V Sloveniji redno uporabljamo AM na področju očesne kirurgije od leta 2000, kar je plod sodelovanja med ZTM in OK UKCL, od leta 2010 tudi z dovoljenjem in akreditacijo Agencije za zdravila pri Ministrstvu za Zdravje RS.

## Metode

Glavna načina uporabe AM v očesni kirurgiji sta uporaba AM kot presadek (angl. *graft*) ali kot obliž (angl. *patch*). Pri prvem načinu presadimo AM z epitelno stranjo navzgor. Njena bazalna membrana je mehansko dovolj čvrsta in hkrati plastična, da z njo prekrijemo defekt očesne površine in jo s šivi pritrdimo na prejemno mesto. Na tako pritrjeno bazalno membrano AM bodo migrirale epitelne celice s sosednjega tkiva, se na njej pričvrstile in se na njej razmnoževale. AM bo tako ostala trajno vrasčena na očesno površino. V primeru uporabe AM kot biološkega obliža želimo predvsem preprečiti nastanek brazgotin in zarastlin tkiva ter zaščititi tkivo pod AM, pri čemer nam dodatno pomagajo protivnetne in protimikrobne lastnosti AM. Ta AM se ne bo trajno vrasla v tkivo in se bo sčasoma stopila in odpadla. Tretji način uporabe AM je t.i. »fill in« pri katerem uporabimo več koščkov AM, da zapolnimo vrzel v tkivu roženice v primeru globoke (perforantne) roženične razjede (Rahman et al., 2008). Pregled indikacij za uporabo AM v očesni kirurgiji je naveden v Tabeli 1 (Sangwan et al., 2004).

Tabela 1. Indikacije za uporabo AM v očesni kirurgiji

<i>mesto</i>	<i>indikacija</i>	<i>način uporabe</i>
veznica	sindrom Stevens-Johnson	presadek
	očesni brazgotinski pemfigoid	presadek
	kemične in termične poškodbe	presadek, obliž
	rekonstrukcija površine po odstranitvi tumorja	presadek
roženica	pomanjkanje limbalnih zarodnih celic	presadek
	bulozna keratopatija	presadek
	perzistentni defekti roženice	presadek, obliž
	roženična razjeda	»fill in«

## Teoretična izhodišča

Amnijska membrana je najbolj notranja od plodovih ovojnic, ki tvorijo posteljico. Debela je od 0.02 – 0.5 mm. Sestavljena je iz strome, bazalne membrane in amnijskih epitelnih celic. Posebnosti strome so, da vsebuje fibroblaste, da je avaskularna in da vsebuje številne biološko aktivne snovi: citokine, rastne faktorje ter inhibitorje proteaz (Tabela 2).

Tabela 2. Nekatere biološko aktivne snovi, ki jih najdemo v AM.

<i>skupina</i>	<i>biološko aktivna snov</i>	<i>učinek</i>
citokini	IL-6	protimikrobni
	IL-10	protivnetni
rastni faktorji	EGF	pospešuje epitelizacijo
	FGF	diferenciacija fibroblastov
	TGF $\beta$	diferenciacija fibroblastov
	HGF	pospešuje epitelizacijo

Bazalna membrana AM je najbolj debela bazalna membrana, kar jih poznamo v človeškem telesu. Po kemični sestavi je zelo podobna bazalnima membranama vezice in roženice, saj vsebuje iste podvrste kolagena (IV, V, VII) ter fibronektin in laminin. Amnijske epitelne celice so posebne po tem, da na svoji površini ne oz. le delno izražajo antigene MHC (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR), ki so odgovorni za imunski odziv na telesu tuje tkivo (Akle et al., 1981). Poleg tega je na njihovi površini izražen antigen HLA-G, ki je povezan z imunotoleranco.

Na podlagi zgoraj naštetega temeljijo znani učinki AM, ki jih uporabljamo v očesni kirurgiji (Tabela 3).

Tabela 3. Učinki AM in mesto, kjer jih koristimo v očesni kirurgiji.

<i>učinek</i>	<i>mesto uporabe</i>
pospeševanje epitelizacije	veznica, roženica
ohranjanje fenotipa epitela	veznica
protivnetno delovanje	veznica, roženica
protibrazgotinsko delovanje	veznica, roženica
preprečevanje zarastlin	veznica
preprečevanje vaskularizacije	roženica
preprečevanje apoptoze	roženica
inhibicija proteaz	roženica

Glavni način uporabe AM je ta, da služi kot podlaga za migracijo, adhezijo in razmnoževanje epitelnih celic. Številni rastni faktorji in citokini pri temu pomagajo in preprečujejo diferenciacijo epitela ter brazgotinjenje.

### **Pregled ugotovitev**

Uporaba AM v očesni kirurgiji se je v zadnjih 20. letih bliskovito razširila s čedalje večjim naborom opisanih indikacij za njeno uporabo in z različnimi kirurškimi tehnikami: presadek, obliž ali »fill-in«. Bazične študije nam omogočajo globlji vpogled v mehanizem delovanja AM na tkivo preko biološko aktivnih snovi v njej. Obenem iz teh študij izhaja, da se AM po svojih bioloških lastnostih razlikuje od dajalca do dajalca in da ostajajo tudi razlike v sestavi AM glede na odvzemno mesto na posteljici (periferno ali blizu popkovnice). Te študije tudi napovedujejo možnost standardizacije postopkov odvzemanja, priprave in shranjevanja AM. AM je relativno enostavno dostopno tkivo v primerjavi z drugimi očesnimi presadki in prav tako ni vprašanja glede razpoložljivosti s količino. AM je zaradi elastičnosti, mehanske trdnosti in prozornosti zelo primerno tkivo za uporabo na očesni površini. Dodatna prednost uporabe AM kot presadka je tudi v tem, da praktično ni opisov zavrnitvene reakcije na AM.

### **Zaključek**

Uporaba AM v očesni kirurgiji zajema številne indikacije in predstavlja terapevtsko možnost pri nekaterih izmed najhujših bolezenskih stanj očesne površine: kemične in termične poškodbe, roženične razjede, očesne brazgotinske bolezni. Glavne pomanjkljivosti metode so nestandardizacija postopka priprave AM in pomanjkanje »evidence-based«  
prospektivnih randomiziranih študij glede njene dejanske učinkovitosti. V prihodnosti bo uporaba AM za gojenje limbalnih zarodnih celic predstavljala pomemben delež njene uporabe v očesni kirurgiji.

### **Literatura**

1. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cell after transplantation into volunteers, *Lancet* 1981;2:1003-5.

2. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910; 15: 307.
3. de Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch phthalmol* 1940,23:522-5.
4. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49:51–77.
5. Kim JCI, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995,14:473-84.
6. Rahman I, Said DG, Maharajan S, and Dua HS. Amniotic membrane
7. in ophthalmology: indications and limitations. *Eye* 2009; 23: 1954–61.
8. Sangwan VS, Burman S, Tejwani S, Mahesh SP, Murthy R. Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:251-260
9. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-45.
10. Sorsby A, Haythorne J, Reed H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1947,31:409-18.

## **Odvzem amnijske membrane in zdravstvena nega bolnika ob presaditvi amnijske membrane**

**Karmen Mlakar Tomšič, dipl. m. s.**

Univerzitetni klinični center, Ljubljana; Očesna klinika; Operacijski blok  
mkarmen.tomsic@gmail.com

### **Izvleček**

Prispevek opisuje postopek odvzema amnijske membrane, pripravo bolnika na presaditev, in dokumentacijo, ki je potrebna pri izvedbi presaditve. Pomembno vlogo pri presaditvi amnijske membrane imajo operacijske medicinske sestre. Za nemoten potek presaditve morajo dobro poznati standarde, postopke, material in dokumentacijo. Predstavljeni so statistični podatki o številu presaditev amnijske membrane na Očesni kliniki v Ljubljani.

**Ključne besede:** *odvzem, amnijska membrana, presaditev, operacijska medicinska sestra, dokumentacija*

### **Uporaba amnijske membrane**

Uporabo amnijske membrane v očesni kirurgiji so prvič opisali leta 1940 in sicer za kritje vrzeli veznice. Amnijska membrana predstavlja notranjo plast posteljice in je sestavljena iz treh plasti: enojne epitelne plasti, sledi debelejša bazalna membrana in nato avaskularna stroma. Sestava amnijske membrane je podobna bazalni membrani roženice. Amnijska membrana vsebuje pomembne protivnetne sestavine, ter snovi, ki pospešujejo celjenje, hkrati pa preprečujejo razrast novega žilja. Uporabljamo jo za vrsto bolezni sprednje površine očesa (Mikek, Pfeifer, Drnovšek, 2004).

### **Postopek odvzema amnijske membrane**

Odvzem amnijske membrane v porodnišnici skupaj izvedeta zdravnik specialist oftalmologa ter diplomirana medicinska sestra z Očesne klinike v Ljubljani.

Amnijsko membrano odvezamo pri načrtovanih, selektivnih carskih rezih po predhodnem telefonskem dogovoru s porodničarjem ginekologom in glavno medicinsko sestro porodnega bloka v porodnišnici Ljubljana. Pred carskim rezom oftalmolog informira porodnico o namenu odvzema amnijske membrane in pridobi njeno pisno soglasje. Prav tako pridobi njeno soglasje za preiskave krvi na HIV, Hepatitis B in C ter sifilis. Med porodom porodničar kirurg posteljico odloži v sterilno ledvičko in jo pokrije s kompresom. Nato posteljico prevzame oftalmolog. Ta najprej preveri identiteto darovalke, obleče sterilni plašč in rokavice, se pokrije s kapo in preko ust in nosu namesti zaščitno masko. Oftalmolog nato preparira amnijsko membrano, medicinska sestra pa jo obilno izpere z intraokularno tekočino z dodanimi antibiotiki. Potem jo položi na nitrocelulozni papir in shrani v sterilni kaseti. Nato amnijsko membrano čimhitreje transportiramo (v roku dvajsetih minut) v Center za tipizacijo tkiv, kjer jo oftalmolog nareže na kose velikosti 4 x 4 centimetre. Te kose amnijske membrane shranimo v shranjevalnem mediju pri - 80°C, v laboratoriju, v sterilnih pogojih. Tako pripravljene amnijske membrane so shranjene na

Zavodu za transfuzijsko medicino. Na posodicah so podatki o času odvzema in šifra darovalke (SOP-TC-72861-04, 2010).

V primeru, kadar potrebujemo amnijsko membrano za presaditev, pokličemo na Zavod RS za transfuzijsko medicino, da nam jo pripravijo. Istočasno ponjo pošljemo kurirja, ki nam jo v najkrajšem možnem času dostavi v operacijski blok. Transport poteka v termično izolirni posodi, v kateri je amnijska membrana obdana z ledom. Ko amnijska membrana prispe v operacijski blok, jo hranimo v izolirni posodi ves čas in jo odtalimo tik preden jo potrebujemo za presaditev.

V povprečju odvzamemo eno amnijsko membrano na leto. Iz nje pridobimo 40 približno enako velikih koščkov.

### **Načrt zdravstvene nege ob sprejemu pacienta na oddelek**

Načrt zdravstvene nege pripravi dipl.m.s. v 24 urah po sprejemu bolnika na oddelek. Izvajajo ga zaposleni v zdravstveni negi glede na pridobljene in priznane kompetence. Ob tem se uporablja standardizirana negovalna dokumentacija: sprejemni dokument zdravstvene nege, list zdravstvene nege in odpustni dokument zdravstvene nege (ND OCK 035, 2012).

Negovalne diagnoze ob sprejemu pacienta na oddelek prikazuje Preglednica 1.

Preglednica 1: Standardni negovalni načrt pri pacientu ob sprejemu

<b>Negovalna diagnoza</b>	<b>Pričakovani cilji</b>	<b>Načrtovanje</b>
Strah	Zmanjševanje ali preprečevanje strahu	Pogovor s pacientom
Bolečina	Zmanjševanje ali izključitev bolečine	Ocena bolečine po VAS
Zaznavanje/nekompenzirana izguba sluha/vida	Zmanjšanje nerazumevanja izrečenega ali onemogočanje poškodb zaradi slabe vidne funkcije	Ocena ogroženosti in ukrepi za preprečevanje, pomoč pri gibanju v prostoru
Nevarnost padcev	Preprečevanje padcev in poškodb	Ocena ogroženosti za padec po Morsejini lestvici, negovalni postopki v skladu z oceno po Protokolu preprečevanja padcev

Vir: ND OCK 035, 2012.

### **Naloge operacijske medicinske sestre pred presaditvijo amnijske membrane**

Operacijska medicinska sestra (OPMS) mora pred presaditvijo amnijske membrane preveriti:

- prejemnikove identifikacijske podatke,
- katero oko bo operirano,
- poročilo o obdelavi in hrambi amnijske membrane od prevzema do izdaje,
- poročilo o sprejemu tkiv/celic,
- donorjeve identifikacijske podatke,
- zalogo materiala in pripomočkov,
- poročilo o presaditvi/uporabi tkiv/celic.

## **Naloge operacijske medicinske sestre med presaditvijo amnijske membrane**

Pri operaciji sodelujeta dve OPMS, prva inštrumentira, druga pa streže kolegici.

Obe OPMS sta odgovorni za nemoten potek operacije, za kar potrebujeta znanje in izkušnje.

Postopek presaditve je razdeljen v posamezne korake:

1. Pred operacijo je bolnik nameščen v prebujevalnico, kjer ga medicinska sestra povpraša o morebitnih spremljajočih boleznih, alergijah in drugih posebnostih. Nato mu vstavi i.v. kanilo, ter prične s kapanjem anestetika v oko.
2. OPMS in bolničarka namestita bolnika na operacijsko mizo. OPMS namesti bolniku kisikova očala, pulzni oksimeter ter kapne anestetik. Bolnik dobi kapljico povidon jodirane raztopine v oko.
3. Čiščenje in razkuževanje operativnega polja okoli zaprtega očesa, ki bo operirano, inštrumentarka izvede najprej 3 krat z 3,75% povidon jodirano raztopino v 0,45% NaCl in 3 krat s tinkturo hibisepta, ki ne sme priti v oko. Razkuži samo kožo in počaka, da se posuši.
4. Inštrumentarka bolnika pokrije s sterilnim pokrivalom. Nato prereže folijo na pokrivalu in vstavi držalo za veke. Oko temeljito spere z 10 mililitri intraokularne raztopine.
5. Položaj inštrumentarke je običajno na strani operiranega očesa. Načeloma pa naj se izbere takšen položaj, ki bo omogočal najoptimalnejše spremljanje operacije in sodelovanje z operaterjem. Obe OPMS spremljata operacijo tudi na monitorju.
6. S pomočjo druge OPMS in bolničarke se namesti mikroskop in potrebni dodatni inštrumenti. Izvede se kontrola delovanja le-teh.
7. Skrbno spremljanje poteka operacije s strani obeh OPMS, je potrebno, da lahko pravočasno reagirata z ustreznim inštrumentom, šivalnim materialom in drugim.
8. Vzdržujemo aseptično in sterilno metodo dela. Nadzorujemo člane operativnega tima, da ostanejo sterilni.
9. Po končani presaditvi OPMS po navodilu operaterja, aplicira očesno terapijo in pokrije ali povije oko.
10. Bolničarka ali OPMS pospremita bolnika nazaj v prebujevalnico, kjer še nekaj časa ostane na opazovanju.
11. Po presaditvi OPMS dokonča obračun operacije, vpiše operacijo v sestrski protokol, ter v zvezek za presaditve amnijske membrane. Nato pošlje izpolnjeno Poročilo o presaditvi/uporabi tkiv/celic po faksu na Slovenija Transplant in na Zavod RS za transfuzijsko medicino.
12. Inštrumentarka pošlje uporabljene inštrumente v sterilizacijo, da se čimprej prične postopek čiščenja, dezinfekcije in sterilizacije.

## **Pooperativno spremljanje – dodatne negovalne diagnoze, cilji in intervencije**

Leta 2011 in 2012 smo na Očesni kliniki v Ljubljani opravili 16 presaditev amnijske membrane.

Ležalna doba bolnika na oddelku je zelo različna, odvisna od diagnoze zaradi katere smo amnijsko membrano presadili. Možne so tudi pooperativne komplikacije, predvsem v smislu odlepljene ali strgane amnijske membrane. V teh primerih je potrebna ponovna, tudi večkratna presaditev.

V veliki večini primerov pa pooperativno vse poteka brez posebnosti in komplikacij.

Negovalne diagnoze po presaditvi amnijske membrane prikazuje Preglednica 2.

Preglednica 2: Standardni negovalni načrt pri pacientu po operaciji

<b>Negovalna diagnoza</b>	<b>Pričakovani cilji</b>	<b>Načrtovanje</b>
Pooperativna bolečina	Zmanjševanje ali izključitev bolečine	Ocena bolečine po VAS, ukrepanje glede na rezultate po protokolu
Nevarnost infekcije rane	Odsotnost infekcije rane v času hospitalizacije	Ocena in izključitev nevarnosti za okužbo, upoštevanje standardov in protokolov preprečevanja bolnišničnih okužb
Nevarnost infekcije krvi	Odsotnost infekcije krvi v času hospitalizacije	Ocena in izključitev nevarnosti za okužbo
Znanje, pomanjkljivo	Poznavanje razumevanja bolezni in zdravljenja ter postopkov zdravljenja	Pogovor s pacientom, zdravstveno vzgojno svetovanje

Vir: ND OCK 035, 2012.

## **Zaključek**

Delo OPMS pri presaditvi amnijske membrane zahteva organizacijske sposobnosti, znanje, izkušnje, predvidevanje, hitro reagiranje, ter dobro sodelovanje s člani operativnega tima. Korekten odnos do bolnika privede do uspešno opravljenega operativnega posega in zadovoljstva vseh sodelujočih.

## **Literatura:**

1. Mikek K, Pfeifer V, Drnovšek-Olup B. Uporaba amnijske membrane v očesni kirurgiji. Zdravniški vestnik, Ljubljana 2004, št. 73: 419-22.
2. Standardni operativni postopek. Očesna klinika Ljubljana, 2010: SOP-TC-72861-04.
3. Standardni negovalni načrt pri pacientu – transplantacija roženice. Očesna klinika Ljubljana, 2012: ND OCK 035.
4. Shaw E.M., Lee A., Stollery R. Ophthalmic Nursing, 4th Edition. Oxford. Wiley-Blackwell. 2010: 149-150.

**NAPREDNO ZDRAVLJENJE S CELICAMI  
V KIRURGIJI**



## Priprava trombocitne plazme za trombocitni gel

dr. Tina Cirman, univ. dipl. biol.<sup>1</sup>, mag. Marko Cukjati, dr. med.<sup>1</sup>, dr. Dragoslav Domanović, dr. med.<sup>2</sup>, izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana; Slovenija

<sup>2</sup> European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Švedska

### Izvleček

Trombociti so brezjedrni celični fragmenti, ki imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju hemostaze in celjenju ran. Standardne trombocitne krvne pripravke uporabljamo za transfuzijsko zdravljenje trombocitopenije in motenj delovanja trombocitov. Ker trombociti vsebujejo več kot 300 različnih beljakovin, od tega več kot 60 biološko aktivnih, ki sodelujejo v vseh fazah celjenja poškodb, lahko trombocitne pripravke uporabljamo tudi za lokalno aplikacijo, da bi pospešili celjenje ran.

S trombociti bogata plazma (TBP, angl. *PRP – platelet rich plasma*) je komponenta krvi, v kateri je koncentracija trombocitov povečana z odstranitvijo plazme. Ob aktivaciji TBP se tvori t. i. trombocitni gel, sestavljen iz fibrina in vanj ujetih celic, ki ga lahko naneseemo na poškodovano mesto. Iz granul aktiviranih trombocitov se ob aktivaciji sprostijo rastni dejavniki in dejavniki strjevanja krvi, ki pospešijo celjenje rane. Trombocitni gel se lahko zaradi teh učinkovin uporablja za pospeševanje celjenja kroničnih ran, kosti, vezi in ligamentov ter zaraščanje ran v estetski, kardiovaskularni, oralni in maksilofacialni kirurgiji.

Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) pripravljamo TBP po validiranem postopku iz levkocitne plasti (angl. *buffy coat*) zdravih krvodajalcev. Priprava TBP poteka v čistih proizvodnih prostorih, v katerih so zagotovljene razmere, kot jih predpisujejo priporočila dobre proizvodne prakse (angl. *good manufacturing practice, GMP*). Za preskrbo s TBP imamo tudi posebno dovoljenje Javne agencije republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP).

**Ključne besede:** trombociti, s trombociti bogata plazma, trombocitni gel, celjenje ran

### Uvod

Trombociti so brezjedrni celični fragmenti, ki nastajajo v kostnem mozgu v procesu celične fragmentacije iz megakariocitov [1]. Prekurzorske celice za trombocite nastanejo – tako kot za ostale krvne celice – iz krvotvornih matičnih celic (KMC). Te preko skupne mieloidne zarodne celice CFU-GEMM, megakarioblasta in promegakariocita dozoriijo v megakariocite. Proces dozorevanja trombocitov natančno uravnava štjevilni rastni dejavniki, od katerih je najbolj znan trombopoetin (TPO).

V periferni krvi zdravega posameznika je  $150\text{--}350 \times 10^9/\text{L}$  trombocitov, katerih življenjska doba je 7–9 dni [1–3]. Po krvi krožijo v mirujoči, neaktivirani obliki. Ob aktivaciji, ki jo sproži stik s poškodovanim epitelijem ali različni fiziološki agonisti (npr. trombin), trombociti zaradi reorganizacije citoskeleta spremenijo obliko ter sprostijo vsebino granul v okolico [3]. To sproži kaskado koagulacije oz. strjevanja krvi. Po aktivaciji se trombociti tudi zlepijo (agregirajo), na njihovi površini pa se izpostavijo nekatere znotrajcelične

molekule, ki lahko služijo kot označevalci aktiviranih trombocitov, npr. CD62 ali P-selektin [4].

Poleg vloge pri vzdrževanju hemostaze [1] so trombociti oz. biološko aktivne snovi, ki jih vsebujejo, pomembne tudi pri imunskem odzivu in pri celjenju ran kot glavni nosilci regenerativnih procesov. V zadnjem času ugotavljajo, da so sposobni prenašati tudi določene dele tumorjev in so udeleženi pri nastanku metastaz [5], [6].

### **Biološko aktivne snovi v trombocitih**

Trombociti vsebujejo mnogo beljakovin (citoskeletnih, signalnih, membranskih, rastne dejavnike ...), katerih večina se nahaja v  $\alpha$ -granulah [7]. Teh je v enem trombocitu od 50–80 [5]. Med njimi so zelo pomembni rastni dejavniki, ki sprožijo in uravnavajo celjenje ran, npr. interlevkin-1 $\beta$ , interlevkin-8, epidermalni rastni dejavnik  $\beta$  (EGF- $\beta$ ), rastni dejavnik keratinocitov (KGF), inzulinu podobni rastni dejavnik 1 (IGF-1), tumorje nekrotizirajoči dejavnik  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bazični in kisli fibroblastni rastni dejavnik (b- in a-FGF), rastni dejavnik A in B iz trombocitov (PDGF A in B), rastni dejavnik žilnega endotelija (VEGF), transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) idr. [2–4].

V trombocitih so poleg rastnih dejavnikov tudi koagulacijske beljakovine, citokini, integrini, vnetne molekule idr. [1]. Skupaj najdemo v trombocitih več kot 300 različnih beljakovin [5] in več kot 60 biološko aktivnih [1], ki so vključene v vse faze celjenja ran, kot so kemotaksa, celična proliferacija in diferenciacija, angiogeneza, odlaganje ekstracelularnega matriksa, uravnavanje imunskega odziva, antimikrobna aktivnost in remodeliranje tkiva [2], [4].

### **Terapevtski produkti iz trombocitov**

V transfuzijski medicini se pripravki trombocitov uporabljajo za zdravljenje trombocitopenije in drugih trombocitnih motenj [4], trombocitne koncentrate pa uporabljamo tudi kot “dostavljalce” biološko aktivnih molekul na mesto poškodbe za pospeševanje celjenja ran [7], [8].

Poznamo različne oblike trombocitnih koncentratov, pripravljenih iz polne krvi:

a) *s trombociti bogata in levkociti osiromašena plazma* (TBP) je del plazemske frakcije krvi, v kateri je koncentracija trombocitov večja od normalne [2]. Čeprav ne obstaja konsenz, kolikokrat večja naj bi ta koncentracija bila, se največkrat omenja vsebnost trombocitov  $1 \times 10^6/\mu\text{L}$  (fiziološka koncentracija je  $0,15\text{--}0,3 \times 10^6/\mu\text{L}$  [9]). Izraz TBP se v literaturi nanaša na avtologne pripravke, ki naj bi bili zaradi zmanjšane tveganja za nastanek trombocitnih protiteles pri prejemniku oz. prenosa bolezni s krvjo varnejši od tujih (alogenih) pripravkov [9]. Kljub temu tudi pri uporabi alogenske TBP niso opazili nobenih okužb pri bolnikih, ki so jih zdravili s trombocitnimi geli [10] in tudi trombocitna protitelesa se pri prejemniku alogenskega pripravka niso razvila [11]. Ob aktivaciji trombocitov v TBP se tvori *trombocitni gel*, iz trombocitov se sprostijo rastni dejavniki in dejavniki strjevanja krvi, ki so v trombocitnih granulah [4]. Trombocitni gel lahko naneseemo na mesto poškodbe, katere zdravljenje želimo pospešiti.

- b) *s trombociti in levkociti bogata plazma* (L-TBP) vsebuje poleg visokih koncentracij trombocitov tudi veliko levkocitov [4]. Ker imajo slednji pomembno vlogo pri prirojenem imunskem odzivu (sodelujejo pri uničevanju bakterij in odstranjevanju poškodovanega tkiva), ni presenetljivo, da L-TBP deluje protimikrobno, čeprav obstajajo o učinku L-TPB nasprotujoča si poročila [4], [7], [8], [12]. Ob aktivaciji L-TBP dobimo *trombocitno-levkocitni gel*.
- c) *s trombociti osiromašena plazma*, iz katere se lahko pripravi *fibrinsko lepilo* je stranski produkt priprave TBP, ki ga dobimo po centrifugiranju. Ker nima trombocitov in s tem niti v njih shranjenih biološko aktivnih molekul, je ta pripravek za pospeševanje celjenja ran manj ustrezen. Kljub temu se uporablja za hitrejše vzpostavljanje hemostaze, saj vsebuje proteine, odgovorne za koagulacijo krvi [12].

### **Priprava TBP iz trombocitov**

Čeprav za pripravo TBP ne obstaja standardiziran postopek, ima večina postopkov nekaj skupnih točk [8]:

- kri se odvzame v embalažo, ki vsebuje antikoagulant; s tem preprečimo, da bi trombociti pred uporabo tvorili strdek [12];
- pripravek dobimo v postopku centrifugiranja; v prvem koraku pridobimo *buffy coat*, ki vsebuje trombocite; v drugem koraku skušamo iz njega odstraniti odvečne eritrocite ter večino plazme, da dobimo s trombociti bogat pripravek;
- dobljeni pripravek aktiviramo ter apliciramo na želeno mesto.

### **Aktivacija trombocitov in nastanek trombocitnega gela**

Ob dodatku določenih snovi (t. im. aktivatorjev ali agonistov) se trombociti v TBP aktivirajo, pri čemer se agregirajo in izločajo substance iz granul, pride tudi do cepitve plazemskega fibrinogena - nastane fibrin, ki polimerizira [12]. Tako nastane krvni strdek (*in vivo*) [3] oz. trombocitni gel (*in vitro*) [2], [8]. Najpogosteje se za aktivacijo uporablja kombinacija trombina in kalcija, obstajajo pa tudi alternativne metode, npr. dodatek batroksobina, neposredna aplikacija na poškodovano tkivo, sunek električnega toka ter večkratno izmenično zamrzovanje in odtajevanje pripravka [4], [12].

Po nastanku strdka začnejo aktivirani trombociti izločati že sintetizirane molekule v 10 minutah. 95 % jih izločijo v eni uri po nastanku strdka. Rastne dejavnike trombociti nato sintetizirajo in izločajo do konca svoje življenjske dobe [2].

### **Uporaba trombocitnega gela**

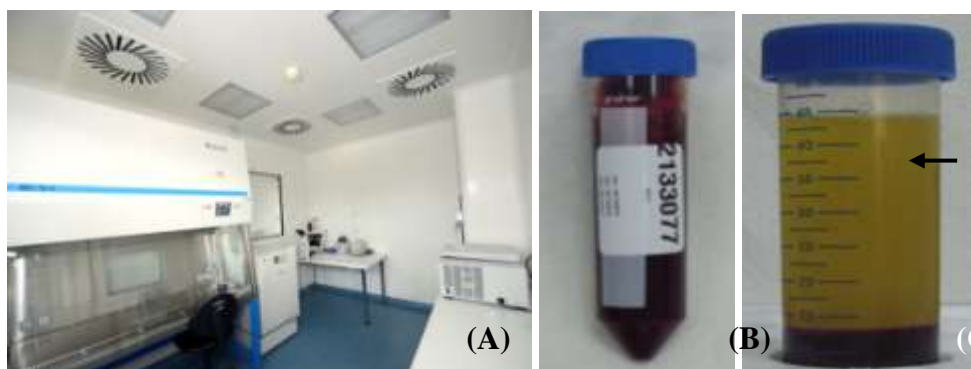
Prvi je o uporabi fibrinskih lepil za celjenje ran in pospeševanje zdravljenja poročal Matras leta 1970 [13], Whitman s sodelavci pa je prvi poročal o uporabi trombocitnega gela v maksilofacialni in oralni kirurgiji leta 1997 [14]. Zdaj se trombocitni gel uporablja za obnavljanje mehkih tkiv in kosti, zdravljenje kroničnih ran, zmanjševanje postoperativnih infekcij, zmanjšanje krvavitev ter lajšanje bolečin. O kliničnih aplikacijah poročajo v perodontalni, maksilofacialni in oralni kirurgiji, pri srčnih obvodih in zdravljenju kroničnih kožnih razjed ter razjed mehkega tkiva [1], [4].

Uporaba trombocitnega gela v regenerativne namene ima veliko prednosti v primerjavi s klasičnimi metodami zdravljenja (npr. manjša bolečina in edem, manjša smrtnost po operaciji srca, manjše število infekcij po operacijah srca, ortopedskih operacijah, manj amputacij pri diabetičnih ranah ...) [4]. O neželenih učinkih skorajda ne poročajo, največja pomanjkljivost je, da za pripravo in uporabo trombocitnega gela ni standardiziranega postopka, niti niso določeni kriteriji kakovosti v povezavi s klinično učinkovitostjo pripravka (npr. število trombocitov v pripravku, način priprave, količina izločenih bioaktivnih molekul, način aktivacije, način in čas aplikacije, način klinične uporabe) [3]. Za pripravo terapevtskih produktov iz trombocitov zdaj obstaja vsaj 16 komercialno dostopnih sistemov [12].

### Priprava s trombociti bogate plazme za trombocitni gel na ZTM

TBP na ZTM pripravljamo po validiranem postopku iz *buffy coat*, ki ga dobimo pri predelavi polne krvi zdravih krvodajalcev. Darovalca levkocitne plasti izberemo tako, da je njegova kri ABO in RhD skladna s prejemnikovo. Darovalec pred odvzemom podpiše dodatno soglasje, da se strinja z uporabo njegove krvi za zdravljenje s tkivi/celicami. Poleg potrditve krvne skupine krvodajalca in standardnih bioloških testov, ki so predpisani za krvodajalce, dodatno opravimo še testiranje anti-HBc, kot to določa zakonodaja s področja preskrbe s človeškimi tkivi in celicami, namenjenimi za zdravljenje. Ker uporaba tehnike pomnoževanja nukleinskih kislin (NAT) občutno skrajša diagnostično okno [15], šestmesečna karantena in ponovno testiranje krvodajalca na HIV nista potrebna.

Priprava TBP poteka v čistih proizvodnih prostorih Laboratorija za celično biologijo (Slika 1A), v katerih so zagotovljene razmere, kot jih predpisujejo priporočila GMP. *Buffy coat* iz odvzemne vrečke aseptično prenesemo v sterilno centrifugirko (Slika 1B) ter centrifugiramo. Supernatant (Slika 1C) prenesemo v svežo centrifugirko, del vzorca pa uporabimo za določitev končnega števila celic v pripravku ter mikrobiološko kontrolo končnega produkta.



Slika 1: (A) Čisti prostori za pripravo TBP, v katerih so zagotovljeni pogoji, kot jih določajo pravila GMP. (B) Izhodiščni vzorec (*buffy coat*) pred centrifugiranjem. (C) *Buffy coat* po centrifugiranju. S trombociti bogata plazma je označena s puščico.

Če TBP ustreza vsem kazalcem kakovosti (primeren volumen, število celic), TBP izdamo (do izdaje TBP hranimo v temi na sobni temperaturi). Opravimo tudi mikrobiološko kontrolo končnega produkta

Celotni postopek pridobivanja *buffy coat*, njegovega testiranja, predelave in izdaje ustreza

zahtevam, ki jih določa *Zakon o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje* (UL RS 61/2007) ter ustrezni podzakonski akti (UL RS 70/2008). Za preskrbo s TBP smo pridobili dovoljenje JAZMP.

## Zaključek

TBP je del frakcije plazme, ki ima 3-5 krat višjo koncentracijo trombocitov kot trombocitni pripravek, pripravljen iz polne krvi enega krvodajalca. Če TBP aktiviramo (z npr. dodatkom kalcija in trombina), se tvori t.i. trombocitni gel, ki ga lahko naneseemo na mesto poškodbe, katere zdravljenje želimo pospešiti. Trombocitne gele uporabljajo za obnavljanje mehkih tkiv in kosti, zdravljenje ran, zmanjševanje postoperativnih infekcij, zmanjšanje krvavitev ter lajšanje bolečin. O kliničnih aplikacijah poročajo v perodontalni, maksilofacialni in oralni kirurgiji, pri srčnih obvodih in zdravljenju kroničnih kožnih razjed ter razjed mehkega tkiva. Na ZTM s TBP trenutno oskrbujemo Kirurško kliniko ter Dermatovenerološko kliniko UKC Ljubljana. V prihodnosti nameravamo TBP pripravljati tudi za druge zainteresirane naročnike.

*Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa ARRS P3-0371 Človeške matične celice – napredno zdravljenje s celicami.*

## Literatura

- [1] P. Rozman and Z. Bolta, "Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries.," *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, vol. 16, no. 4, pp. 156–65, Dec. 2007.
- [2] S. Mehta and J. T. Watson, "Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications.," *Journal of orthopaedic trauma*, vol. 22, no. 6, pp. 432–8, Jul. 2008.
- [3] W. S. Pietrzak and B. L. Eppley, "Platelet rich plasma: biology and new technology.," *The Journal of craniofacial surgery*, vol. 16, no. 6, pp. 1043–54, Nov. 2005.
- [4] D. S. D. M. S. P. Rozman, "Advances in Regenerative Medicine," in *Advances in regenerative medicine.*, S. Wislet-Gendebien, Ed. InTech, 2011, pp. 319–348.
- [5] I. Andia, M. Sánchez, and N. Maffulli, "Basic Science: Molecular and Biological Aspects of Platelet-Rich Plasma Therapies," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 22, no. 1, pp. 3–9, Mar. 2012.
- [6] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem, and M. Tomic-Canic, "Growth factors and cytokines in wound healing.," *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, vol. 16, no. 5, pp. 585–601.
- [7] G. Gobbi and M. Vitale, "Platelet-Rich Plasma Preparations for Biological Therapy: Applications and Limits," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 22, no. 1, pp. 10–15, Mar. 2012.
- [8] D. M. Dohan Ehrenfest, L. Rasmusson, and T. Albrektsson, "Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF).," *Trends in biotechnology*, vol. 27, no. 3, pp. 158–67, Mar. 2009.
- [9] R. E. Marx, "Platelet-rich plasma: evidence to support its use.," *Journal of oral and maxillofacial surgery*: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, vol. 62, no. 4, pp. 489–96, Apr. 2004.
- [10] G. Bernuzzi, S. Tardito, O. Bussolati, D. Adorni, S. Cantarelli, F. Fagnoni, A. Rossetti, M. Azzarone, E. Ficarelli, E. Caleffi, G. Gazzola, and M. Franchini, "Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion

- Centre of Parma.” *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, vol. 8, no. 4, pp. 237–47, Oct. 2010.
- [11] D. Smrke, B. Gubina, D. Domanovic, and P. Rozman, “Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect.” *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes*, vol. 39, no. 3, pp. 170–4, Jan. 2007.
- [12] A. S. Wasterlain, H. J. Braun, and J. L. Drago, “Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma,” *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 22, no. 1, pp. 33–42, Mar. 2012.
- [13] H. Matras, “[Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin].” *Österreichische Zeitschrift für Stomatologie*, vol. 67, no. 9, pp. 338–59, Sep. 1970.
- [14] D. H. Whitman, R. L. Berry, and D. M. Green, “Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.” *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, vol. 55, no. 11, pp. 1294–9, Nov. 1997.
- [15] J. Weusten, M. Vermeulen, H. van Drimmelen, and N. Lelie, “Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms.” *Transfusion*, vol. 51, no. 1, pp. 203–15, Jan. 2011.

## Zdravljenje kirurškega bolnika s trombocitnim gelom

Danijela Semenič, dr. med.<sup>1</sup>, prof. dr. Dragica Maja Smrke, dr. med.<sup>1</sup>,  
izr. prof. dr. Primož Rožman, dr. med.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center, Ljubljana; Klinični oddelek za kirurške okužbe

<sup>2</sup>Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
nela.semenic@gmail.com

### Izvleček

Trombociti so med evolucijo ob njihovi usmerjenosti v hemostazo ohranili zmožnost svojih predhodnikov – univerzalnih krvnih celic – sposobnost imunske obrambe in formacije tkiva. Trombocitni gel pridobimo z aktivacijo trombocitne plazme z ustreznimi agonisti. Po izvoru je trombocitni gel avtologni ali alogenski. V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana ga uporabljamo za zdravljenje nezaraščanja zlomov dolgih kosti in pri celjenju defektov mehkih tkiv.

**Ključne besede:** *trombocitni gel, trombocitna plazma, regenerativna medicina v kirurgiji, celjenje ran*

### Uvod

Nastanek trombocitnega gela je bil prvič opisan že leta 1970. Avtologno trombocitno plazmo so kot stranski produkt multikomponentne afereze z aktivacijo trombocitov spremenili v trombocitni gel (Rosenthal et al, 1975).

Trombocitni gel nastane po koncentriranju in centrifugiranju trombocitne plazme, ki je nato izpostavljena agonistu. Sledi aktivacija trombocitov in kaskada koagulacije, kar vodi k nastanku strdku podobne želatinaste substance, imenovane trombocitni gel. Aktivirani trombociti ujeti v fibrinsko mrežo sproščajo intrizične aktivne substance, ki prehajajo v okolico. Sproščajo se visoke koncentracije kemotaktičnih faktorjev. Biorazpoložljivost rastnih faktorjev je odvisna od števila shranjenih rastnih faktorjev v trombocitih, delež le teh se uniči med obdelavo trombocitov.

Trombociti vsebujejo v svojih alfa – granulah številne rastne faktorje (platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor alpha & beta (TGF- $\alpha$  &  $\beta$ ), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin growth factor (IGF), platelet derived epidermal growth factor (PDEGF), platelet derived angiogenesis factor (PDAF), interleukin-8 (IL-8), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), connective tissue growth factor (CTGR), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), keratinocyte growth factor (KGF), in angiopoetin (Ang-2) in najmanj 60 različnih biološko aktivnih substanc, ki so vpletene v mehanizme celjenja tkiva kot so kemotaksa, celična proliferacija in diferenciacija, angiogeneza, depozicija ekstracelularnega matriksa, imunska modulacija, antimikrobno delovanje in remodeliranje tkiva (Frechette et al, 2005; Borzini et al, 2005; Westerhuis et al, 2005; Everts et al, 2006; Rožman 2002).

## **Uporaba trombocitnega gela**

Sprva se je trombocitni gel uporabljal na brezšivnih anastomozah živcev. Celjenje je bilo učinkovito (Fischer, 1979). V tkivu so opazili pospešeno migracijo fibroblastov, depozite kolagena in večji razrast granulacij (Englert et al, 2008; Gunaydin et al, 2008). Kemotaktični faktorji v trombocitnem gelu so zagotavljali kontinuirano stimulacijo mezenhimskih celic. Le te so interagirale s fibrinom in spodbujale razrast granulacijskega tkiva (McClain et al, 1996). Kasneje so trombocitni gel pričeli uporabljati v maksilofacialni kirurgiji, z namenom boljše regeneracije kosti (Marx et al, 1998). Nanašali so ga na poškodbene rane, opekline, postoperativne rane v različnih vejah kirurgije. Posebno mesto pa je pridobil v zdravljenju kroničnih ran in ulkusov (Rožman, Bolta 2007).

### ***Kosti***

V kombinaciji z avtologno spongiozno kostnino, ki vsebuje matične celice, je uporaben pri zdravljenju nezaraščanja zlomov dolgih kosti in kostnih defektov (Smrke et al, 2007). Uspešno so bili zdravljeni bolniki s poškodbeno amputacijo distalne falange, kjer je defekt kostnine predstavlja oviro v celostni regeneraciji tkiva in estetskem rezultatu (Balbo et al, 2010). Uporabili pa so ga tudi pri operativnih posegih hrbtenice (posterolateralna spinalna fuzija) za zagotovitev večje stabilnosti skeleta (Castro, 2004).

### ***Tetive in ligamenti***

Tetive in ligamenti imajo slabo prekrvavitev. Poškodba kolen, gležnjev, ram, komolcev, zapestji, tetiv bicepsa in Ahilove tetive so relativno pogoste. Ortopedi, ki se ukvarjajo s športnimi poškodbami so injicirali trombocitni gel pod ultrazvočno kontrolo. Bolniki so imeli krajši čas rehabilitacije (Everts et al, 2006).

### ***Estetska kirurgija***

Privatni centri po svetu ponujajo terapijo s trombocitnim gelom, ki ga injicirajo v kožo pri naslednjih posegih: facelift, blefaroplastike, rekonstrukcije dojk, mamoplastike, abdominoplastike. Uporablja se tudi pri kožnih režnjih. Vsadki imajo manj zavrnitvenih reakcij, boljša je retenca vsadka, manj je otekline (Brown et al, 2006; Sclafani 2005).

### ***Kardiovaskularna kirurgija***

Vnetje postoperativne rane po kardiovaskularnem posegu ima lahko hude posledice. Vodi lahko v reoperacijo, podaljšan čas zdravljenja v intenzivni enoti, večjo smrtnost, več stroškov zdravljenja ter nenazadnje zmanjša bolnikovo kakovost življenja. Antimikrobna aktivnost levkocitov in trombocitov zmanjša verjetnost infekta po operaciji (Englert et al, 2008; Gunaydin et al, 2008; Trowbridge et al, 2005).

### ***Oralna in maksilofacialna kirurgija***

Namenjen je standardnemu zdravljenju kostnega defekta, tako pri endoosalnih implantatih, kot tudi pri rekonstrukcijah čeljusti in ostalih obraznih kosti (Marx et al, 1998; Mendez et al, 2006).

### ***Ostale aplikacije***

Trombocitni gel se uporablja v oftalmologiji, pospeši celjenje površine roženice (Lee, Kang, 2011).

Zdravljeni so bili nevrološki bolniki s Parry-Rombergovim sindromom (progresivno hemifacialno atrofijo), ki je degenerativna in še vedno nepojasnjena bolezen. Po aplikaciji

trombocitnega gela v predel obraza, se je napredovanje bolezni upočasnilo, ter v nekaj letih stabiliziralo (Cervelli, Gentile, 2009).

### **Naše izkušnje zdravljenja kirurških bolnikov**

V letu 2007 smo pričeli z zdravljenjem bolnikov z nezaraščanjem zlomov dolgih kosti. Šlo je za psevdartroze po zlomih dolgih kosti, pri katerih kljub osteosintezi ni prišlo do zadovoljivega celjenja zloma. Uporabljen je bil avtologni trombocitni gel, pridobljen iz bolniku lastne trombocitne plazme. Po aktivaciji trombocitne plazme s kalcijem in fibrinom, je nastal trombocitni gel. Nato je bil zmešan z avtologno spongiozno kostjo bolnika. Kombinacija spongiozne kosti in trombocitnega gela je bila aplicirana v področje nezaraščanja zloma. Rezultati so bili ugodni, celjenje pospešeno, kostni kalus trden. Po enem letu je bilo možno odstraniti osteosintetski material. Dosežena je bila stabilnost kosti (Smrke et al, 2007).

Naše klinične izkušnje in znanje smo prenesli tudi v zdravljenje defektov mehkih tkiv (Rožman et al, 2011). Gre za kronične rane različne etiologije, tako venske, arterijske, kombinirane rane in diabetične razjede. Trenutno je na Kliničnem oddelku za kirurške okužbe v teku ambulantno zdravljenje kroničnih ran z alogenskim trombocitnim gelom. Gre za novo metodo same priprave ter tudi aktivacije trombocitnega gela, ki je plod sodelovanja Kliničnega oddelka za kirurške okužbe in Zavoda za transfuzijsko medicino. Za razliko od že opisanih metod dvo-tirne aktivacije, je naša metoda izboljšana (štiri-tirna). Trombocitni gel je tako bolj obstojen. Bolnike spremljamo po posebej zato pripravljenem protokolu. Alogensko trombocitno plazmo vedno aktiviramo ob bolniku, in sveže pripravljen alogenski trombocitni gel nanašamo na kronične rane. Spremljamo velikost rane, ter spreminjanje same strukture dna rane. Opažamo pozitivne učinke na celjenje. Končni rezultati bodo znani do konec leta 2013.

### **Zaključek**

Trombociti so med evolucijo ob njihovi usmerjenosti v hemostazo ohranili zmožnost svojih predhodnikov (univerzalnih krvnih celic), sposobnost imunske obrambe in formacije tkiva. Lahko trdimo, da imajo dragoceno terapevtsko vrednost in ponujajo možnost uporabe v regenerativni medicini in tkivnem inženiringu.

### **Literatura**

1. Balbo, R., Avonto, I., Marenchino, D., Maddalena, L., Menardi, G. & Peano, G. (2010). Platelet gel for the treatment of traumatic loss of finger substance. *Blood Transfus*, Vol.8, No.4, (October 2010), pp. 255-9
2. Borzini, P. & Mazzucco, L. (2005). Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion*, Vol.45, No.11, (November 2005), pp. 1759-67
3. Brown, S.A., Appelt, E.A., Lipschitz, A., Sorokin, E.S. & Rohrich, R.J. (2006). Platelet gel sealant use in rhytidectomy. *Plast Reconstr Surg*, Vol.118, No.4, (September 2006), pp. 1019-25
4. Castro, F.P., Jr. (2004). Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. *J Spinal Disord Tech*, Vol.17, No.5, (October 2004), pp. 380-4

5. Cervelli, V. & Gentile, P. (2009). Use of platelet gel in Romberg syndrome. *Plast Reconstr Surg*, Vol.123, No.1, (January 2009), pp. 22e-33e
6. Englert, S.J., Estep, T.H. & Ellis-Stoll, C.C. (2008). Postoperative surgical chest and leg incision sites using platelet gel: a retrospective study. *J Extra Corpor Technol*, Vol.40, No.4, (December 2008), pp. 225-8
7. Everts, P.A., Brown Mahoney, C., Hoffmann, J.J., Schonberger, J.P., Box, H.A., van Zundert, A. & Knape, J.T. (2006a). Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors*, Vol.24, No.3, (September 2006), pp. 165-71
8. Everts, P.A., Devilee, R.J., Brown Mahoney, C., Eeftinck-Schattenkerk, M., Box, H.A., Knape, J.T. & van Zundert, A. (2006b). Platelet gel and fibrin sealant reduce allogeneic blood transfusions in total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*, Vol.50, No.5, (May 2006), pp.593-9
9. Fischer, H. (1979). A method of suture-free anastomosis of nerve transplantation is being reported, using facial nerve as the example. *Laryngol Rhinol Otol*, Vol.58, No.2 (February 1979), pp. 154-6
10. Frechette, J.P., Martineau, I. & Gagnon, G. (2005). Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*, Vol.84, No.5, (May 2005), pp. 434-9
11. Gunaydin, S., McCusker, K., Sari, T., Onur, M., Gurpinar, A., Sevim, H., Atasoy, P., Yorgancioglu, C. & Zorlutuna, Y. (2008). Clinical impact and biomaterial evaluation of autologous platelet gel in cardiac surgery. *Perfusion*, Vol.23, No.3, (May 2008), pp. 179-86
12. Lee, J.H. & Kang, N.Y. (2011). Comparison of fibrin glue and sutures for conjunctival wound closure in strabismus surgery. *Korean J Ophthalmol*, Vol.25, No.3, (June 2011), pp.178-84
13. Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E. & Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, Vol.85, No. 6, (June 1998), pp. 638-46
14. McClain, S.A., Simon, M., Jones, E., Nandi, A., Gailit, J.O., Tonnesen, M.G., Newman, D. & Clark, R.A., (1996). Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol*, Vol.149, No.4, (October 1996), pp. 1257-11 70
15. Mendez, R., Lopez-Cedrun, J.L., Patino, B., Vazquez, I., Martin-Sastre R., Tellado, M.G. & Vela, D. (2006). Platelet-rich plasma (platelet gel) in secondary alveoloplasty in cleft patients. *Cir Pediatr*, Vol.19, No.1, (January 2006), pp. 23-6
16. Rožman, P. (2002). Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol*, Vol.10, No.2-3, (August 2002), pp.165-181
17. Rožman, P. & Bolta, Z. (2007). Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, Vol.16, No.4, (December 2007), pp. 156-65
18. Rožman P., Semenič D., Smrke D.M.; The role of platelet gel in regenerative medicine, Book: Advances in regenerative medicine, In Tech Open, Chapter 15, 11/2011
19. Rosenthal, A.R., Harbury, C., Egbert, P.R. & Rubenstein, E. (1975). Use of a platelet fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol*, Vol.14, No.11, (November 1975), pp. 872-5
20. Scalfani, A.P., Romo, T., Ukrainsky, G., McCormick, S.A., Litner, J., Kevy, S.V. & Jacobson, M.S. (2005). Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Arch Facial Plast Surg*, Vol.7, No.3, (May-June 2005), pp. 163-9
21. Smrke, D., Gubina, B., Domanovic, D. & Rozman, P. (2007). Allogeneic Platelet Gel with Autologous Cancellous Bone Graft for the Treatment of a Large Bone Defect. *Eur Surg Res*, Vol. 39, No.3, (March 2007), pp.170-4
22. Trowbridge, C.C., Stammers, A.H., Wood, G.C., Murdock, J.D., Klayman, M., Yen, B.R., Woods, E. & Gilbert, C. (2005). Improved outcomes during cardiac surgery: a multifactorial enhancement of cardiopulmonary bypass techniques. *J Extra Corpor Technol*, Vol.37, No.2, (June 2005), pp. 165-72
23. Westerhuis, R.J., van Bezooijen, R.L. & Kloen, P. (2005). Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury*, Vol.36, No.12, (December 2005), pp. 1405-12

## **Zdravstvena nega kirurških bolnikov zdravljenih s trombocitnim gelom**

**Adrijana Debelak, dipl.m.s., univ.dipl.org.**

Univerzitetni klinični center, Ljubljana  
Klinični oddelek za kirurške okužbe

### **Izvleček**

S staranjem populacije je tudi kronična rana postala vse večji problem družbe po celem svetu. Znano je, da so vse kronične rane v osnovi enake, vendar z različnim ozadjem spremljajočih bolezni.

Medicinska sestra in zdravnik lahko s svojim znanjem in zdravstveno nego izboljšata zdravljenje rane ter njene okolice. Vsako rano je potrebno ustrezno pripraviti na proces celjenja. Zdravljenje s trombocitnim gelom je eden izmed pomembnejših in uspešnejših načinov zdravljenja kroničnih ran. Sproščanja različnih snovi iz trombocitov pospeši celjenje rane in tkiva v oklici rane. Prispevek predstavlja zdravstveno nego ran po priporočilih Evropske zveze za oskrbo ran.

**Ključne besede:** *zdravstvena nega, trombocitni gel, kronična rana, okolica rane*

### **Uvod**

Prvotno se je trombocitni gel uporabljal za zmanjšanje izgub krvi med operacijo, kasneje pa so opazili, da se rane ob uporabi trombocitnega gela hitreje celijo. Danes je uporaba trombocitnega gela zelo široka (ortopedija, travmatologija, plastična kirurgija, ORL kirurgija, zobozdravstvo, nevrokirurgija, urologija, kardiovaskularna kirurgija itd.). Trombocitni gel s svojimi spojinami pospeši vraščanje novih žil po operaciji in tako poveča verjetnost uspešnosti operacije in preživetja tkiva (Zavod, 2011).

V letu 2013 smo na Kliničnem oddelku za kirurške okužbe začeli s študijo uporabe trombocitnega gela pri diabetikih, kateri imajo kronično rano kot posledico sladkorne bolezni. Ti pacienti imajo tudi običajno motnje krvnega pretoka ter prizadeto in občutljivo okolico rane. S strokovno zdravstveno nego kože v okolici rane lahko medicinska sestra pospeši celjenje rane.

### **Priprava rane na celjenje**

Evropska zveza za oskrbo ran (EWMA) je leta 2004 izdala dokument »Priprava dna rane v praksi«. Dokument navaja smernice za pripravo rane na proces celjenja. Izpostavljena je razlika med akutno in kronično rano ter opisani dejavniki, ki upočasnijo, zavrejo ali vplivajo na poslabšanje stanja rane. Priprava dna rane pripomore k odstranitvi ali zmanjšanju vpliva teh dejavnikov.

Smernice priporočajo pripravo dna rane s pomočjo TIME koncepta. Ta omogoča sistematično in kontinuirano oskrbo rane s pomočjo logičnih in strateško usmerjenih komponent.

Model opisuje zgolj lokalni pristop k oskrbi rane. Poleg tega je potrebno pacienta obravnavati holistično in upoštevati vse psihosomatske in socialne dejavnike, ki vplivajo na uspeh zdravljenja.

## **Komponente TIME koncepta**

### ***T- oskrba tkiva***

Kronične rane običajno vsebujejo nekrotično tkivo in nevitalne obloge. Ena najpomembnejših strategij pri oskrbi kroničnih ran je odstranjevanje tega tkiva oz. očiščenje rane (debridment). S tem odstranimo neprekrvavljeno tkivo, bakterije in celično breme, ki upočasnjuje celjenje ran in tako zagotovimo okolje, ki stimulira rast granulacij. »Debridment« je pri kroničnih ranah običajno potrebno izvesti večkrat. Izvaja se lahko na različne načine: kirurško, mehansko, encimsko, biološko, avtolitično itd (EWMA, 2004).

### ***N- nadzor nad vnetjem in okužbo***

Kronične rane so vedno kontaminirane, mnogokrat pa močno kolonizirane ali celo okužene (bakterije, glive). Vzrok temu so daljša časa odprte rane in vpliv drugih dejavnikov kot so slaba prekrvitev, hipoksija, bolezenski procesi, ki potekajo v ozadju. Bakterijsko kolonizacijo ali okužbo, zaradi katere se rana ne celi je potrebno agresivno in hitro obravnavati.

Težave pri celjenju mnogokrat povzročata tudi prisotnost biofilma v rani. Biofilm so bakterijske kolonije, ki jih obkrožata zaščitni polisaharidni plašč.

Za zmanjšanje vnetne reakcije in bakterijskega bremena se izvede »debridment«, lahko pa se uporabijo tudi antibakterijske obloge. Obloge z dodatkom srebra so zelo priljubljene, vendar pa raziskave kažejo, da so med njimi močna odstopanja predvsem glede učinkovitosti na bakterije (EWMA, 2004).

### ***M- ravnovesje vlage***

Vlažno okolje v rani pospeši reepitalizacijo rane. Na tej osnovi se je pričel razvoj sodobnih oblog, ki ohranjajo vlažno okolje v rani. Zagotavljanje vlažnega okolja le z zadrževanjem izločka v rani je lahko škodljivo. Ravnovesje vlage v rani pomeni tudi preprečevanje maceracije. Ravnovesje vlage lahko zagotovimo s strokovnim in tehtnim izborom primernih tako primarnih kot sekundarnih oblog (EWMA, 2004).

### ***E- epiteljski napredek***

Opazovanje epiteljskega napredka oz. napredka robov rane kaže na učinkovitost oskrbe rane. Proces epitelizacije je lahko okrnjen zaradi mnogih razlogov. Mnogi avtorji opozarjajo, da je potrebno še enkrat preveriti prve tri komponente koncepta (TIM) preden se posvetimo komponenti E, saj se na tej stopnji mnogokrat odločimo za drage terapije.

Predvsem je pomembna objektivna ocena napredka rane, ki jo lahko med drugim zagotovimo tudi z dosledno dokumentacijo postopkov oskrbe rane (EWMA, 2004).

## **Zdravstvena nega okolice kronične rane**

Okolica kronične rane je lahko zelo občutljiva, zato jo je potrebno skrbno negovati. Zaščitna sredstva se izbere individualno glede na problematiko in tip pacientova kože.

Macerirana koža v okolici rane lahko povzroči povečanje oz. širjenje rane. Potrebno jo je zaščititi. Primerno zaščito se lahko doseže s posebej v ta namen izdelanimi kremami, ki se jih nanese v tankem sloju okrog rane. Terapevtske obloge za rane imajo tudi običajno pozitivne lastnosti za okolico ran in tako vzdržujejo primerno vlažnost rane in okolice (poliuretanske pene, hidrofibre itd.)

Izredno suha koža v okolici rane je luskasta in občutljiva na lepila. Terapevtskih oblog z lepljivimi robovi se zato ne uporablja. Obloge se pričvrsti s povojem. Sicer pa se lahko lepila iz kože v okolici rane odstranjuje s posebej v ta namen pripravljenimi pršili, ki ne povzročajo dodatnih poškodb povrhnjice. Suha koža v okolici se namaže z raznimi mazili ali kremami, ki kožo obnavljajo in vzdržujejo vitalno. Zdrava koža v okolici rane tako preprečuje nastanek ragad, ki predstavljajo vstopno mesto za mikroorganizme.

Zaščitna sredstva za okolico kronične rane se vedno nanaša na temeljito očiščeno in osušeno kožo v tankem sloju. Nanos naj bo nežen, z zaščitno rokavico, hkrati pa se lahko predel tudi rahlo zmasira.

## **Bolečina**

Definicija bolečino opisuje kot neprijeten senzoričen in emocionalen občutek, ki je povezan z dejansko ali potencialno okvaro tkiva. S stališča zdravstvene nege je bolečina peta vitalna funkcija (EWMA, 2002).

Pri prevezi rane se še vedno nezadostno uporabljajo metode za nadzor bolečine. Holistični pristop pri obravnavi pacinetov omogoča tudi ustrezno oceno bolečine. Zmanjšanje ali odsotnost bolečine lahko dosežemo s strokovno izvedbo zdravstvene nege rane, ustreznim izborom obloge (zdravnik) in adekvatno analgezijo. Strokovna usposobljenost, znanje, motivacija in timski pristop so ključnega pomena za zmanjšanje bolečine ob prevezi rane in zdravljenju rane. Zmanjšanje bolečine pomebno vpliva na zadovoljstvo pacientov.

## **Zaključek**

Uporaba trombocitnega gela pri diabetikih s kronično rano je pospešila rast granulacij in epitelizacijo kronične rane brez alergijskih reakcij.

Pomemben prispevek pri celjenju ran ima tudi medicinska sestra, ki izvaja aseptičen postopek preveze rane z okolico. Prav tako so pomembni zdravstveno vzgojni pogovori in priporočila za paciente.

## **Literatura**

1. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Wound Bed Preparation in Practice. London; 2004.
2. European Wound Management Association (EWMA). Pain at wound dressing changes. London; 2002.
3. Polni življenja. Življenje teče. Letno poročilo transfuzijske službe v Sloveniji 2011. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino; 2011.



**ZDRAVLJENJE S CELICAMI  
V HEMATOLOGIJI**



## Zdravljenje hematoloških bolnikov s presaditvijo krvotvornih matičnih celic

**Karla Renner, dr. med., spec. int. med.**

Univerzitetni klinični center, Ljubljana

Klinični oddelek za hematologijo

karla.rener@mf.uni-lj.si

### Izvleček

Presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) je možnost zdravljenja, s katero lahko zdravimo številne maligne in nemaligne bolezni. Krvotvorne matične celice imajo tri ključne lastnosti, ki nam omogočajo njihovo široko uporabo: imajo regeneracijsko sposobnost, se diferencirajo v visoko specifične krvne celice in po krvnem obtoku najdejo pot do prejemnikovega kostnega mozga. Sposobne so ohraniti vitalnost tudi po daljšem obdobju hranjenja pri nizkih temperaturah. Glede na odnos dajalec - prejemnik, ločimo singenično, avtologno in alogenično (sorodno, nesorodno) presaditev krvotvornih matičnih celic. Vir krvotvornih matičnih celic je tako lahko bolnik sam ter sorodni ali nesorodni darovalec. Multipotentne krvotvorne matične celice pridobimo praviloma v postopku cistaferoze, redkeje s klasičnim odvzemom kostnega mozga ali pa iz popkovnične krvi.

PKMC nam v postopku priprave bolnika na zdravljenje dopušča zdravljenje z visokimi odmerki citostatikov in/ali obsevanjem celotnega telesa, s katerim želimo doseči čim boljše odstranitev malignih ali drugače spremenjenih celic. V primeru alogenične PKMC pa izkoriščamo še učinek presadka proti bolezni. Cilj zdravljenja je v primeru avtologne PKMC čim boljša zazdravitev bolezni, v primeru alogenične PKMC pa ozdravitev. Zdravljenje indiciramo glede na vrsto bolezni, starost ter bolnikovo telesno in psihično zmogljivost, saj je izredno zahtevno in povezano s številnimi zapleti in v primeru alogenične transplantacije tudi z visoko smrtnostjo.

**Ključne besede:** *krvotvorne matične celice, avtologna presaditev, alogenična presaditev, zapleti presaditve krvotvornih matičnih celic, reakcija presadka proti gostitelju*

### Uvod

Kostni mozeg je hematopoetski organ, v katerem iz krvotvorne matične celice nastajajo vse vrste krvnih celic. Matične celice so sposobne samoobnove in diferenciacije v določeno vrsto krvnih celic, v določenih okoliščinah pa tudi v nehematopoetske celice (miocite, hepatocite, nevrnalne celice). Pri odraslem človeku se hematopoeza odvija v rdečem kostnem mozgu, ki se nahaja v prostorih med trabekulami spongioze vretenc, medenice, reber in proksimalnih epifizah stegenic ter ob podpori hematopoetskega mikrookolja (oporno tkivo, sinusoidi iz kapilarnega mrežja). Dnevno nastaja preko 2,5 milijarde eritrocitov, 2,5 milijarde trombocitov in 1 milijarda granulocitov na kg telesne teže. Proces hematopoeze je natančno uravnavan in v njem sodelujejo številni monokini, limfokini, citokini. Nekateri od teh s pridom uporabljamo v terapevtske namene (granulocit stimulirajoči faktorji, eritropoetini, trombopoetini). Ti so ključni tudi pri mobilizaciji krvotvornih matičnih celic (KMC) v periferno kri iz katere jih nato pridobimo s postopkom cistaferoze. KMC imajo na svoji površini CD 34+ imunološki označevalec. Za popolno obnovo hemopoeze pri prejemniku zadošča manj kot 10 % darovalčevega

kostnega mozga" ali  $2 \times 10^6$  CD 34 pozitivnih KMC/kg prejemnikove teže (Zver, 2011). Ker lahko pridobimo KMC iz kostnega mozga, periferne krvi ali popkovne krvi novorojencev, sedaj govorimo o presaditvi KMC in ne več o presaditvi kostnega mozga. Klasični odvzem kostnega mozga poteka iz medenične kosti v splošni anesteziji in je tako povezan z večjo možnostjo zapletov kot zbiranje KMC s citaferozo. Izvaja se samo še na željo dajalca, ki ne želi zbiranja s postopkom citaferoze.

V zadnjih letih tako praviloma zbiramo KMC iz periferne krvi s postopkom CD 34+ selektivne citaferoze po predhodni stimulaciji z za granulocitne kolonije stimulirajočim dejavnikom (G-CSF). G-CSF lahko dodamo citostatik ali plerixafor. Pomembno je, da bolniki, ki so kandidati za avtologno presaditev KMC pred zbiranjem KMC ne prejemajo terapije (alkilozirajoči agensi), ki močno okvari mikrookolje kostnega mozga in število KMC v tolikšni meri, da zbiranje KMC ni uspešno. Tretji vir je popkovnična kri novorojenca, v kateri pa je premalo KMC za odraslega prejemnika, čeprav v primeru popkovnične krvi zadošča že  $1,5 \times 2 \times 10^6$  CD 34 pozitivnih KMC/kg telesne teže prejemnika za zadostno regeneracijo kostnega mozga (Provan et al., 2011) Iskanje nesorodnih dajalcev KMC poteka preko centra za tipizacijo tkiv, ki je del Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. V mreži svetovnega registra v katerega je vključena tudi Slovenija, je že več kot 19 milijonov potencialnih darovalcev.

### **Indikacije za avtologno presaditev KMC**

Avtologna PKMC je indicirana za zdravljenje nekaterih ne-Hodgkinovih limfomov (NHL), v prvi vrsti diseminiranega plazmocitoma in v nekaterih primerih redkejših limfomov kot je npr. limfom plašnih celic, folikularni limfom in tudi primarne amiloidoze, akutne mieloblastne levkemije (AML) in Hodgkinove bolezni.

Pri avtologni PKMC bolnik prejme svoje KMC in dodatna imunosupresivna terapija ni potrebna. Ta način zdravljenja nudi možnost boljše zazdravitve bolezni, ne pa ozdravitve, kot velja za alogenično PKMC.

### **Indikacije za alogenično presaditev KMC**

Alogenična PKMC je indicirana za zdravljenje AML, akutne limfoblastne levkemije (ALL), mielodisplastičnih sindromov (MDS), pri nekaterih NHL, ki so neodzivni na imunokemoterapijo, kronični mieloični levkemiji (KML) neodzivni na zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji ter nemalignih boleznih, kot so prirojena stanja hude imunske pomanjkljivosti, talasemije, anemije srpastih celic, aplastične anemije in anemije Blackfan-Diamond.

### **Mieloablativna/nemioloablativna PKMC**

Praviloma se v klinični praksi uporablja mieloablativna PKMC, ko bolnike pred presaditvijo zdravimo z velikimi odmerki citostatikov in/ali obsevanjem celega telesa. To zdravljenje imenujemo kondicioniranje. Cilj je odstraniti vse maligne ali drugače bolezensko spremenjene celice, hkrati pa nepovratno uničimo tudi ostale, sicer zdrave, celice hematopoeze. Nato bolniku damo zbrane KMC, da te obnovijo hematopoezo. Ker je tovrstno zdravljenje zelo agresivno, so se v zadnjem desetletju razvili številni milejši

načini kondicioniranja (nemieloablativni), z nižjimi odmerki citostatikov, ki povzročijo prehodno zavoro imunskega sistema, ki omogoči "engraftment" darovalčevih celic, ne pa popolnega uničenja malignih celic. Tako je tu za zdravljenje ključna reakcija presadka proti tumorju, ki jo lahko dodatno povečamo še z naknadnimi aplikacijami darovalčevih limfocitov. Umrljivost je prve mesece manjša kot pri mieloblativnem kondicioniranju, kasneje pa se zaradi enakih poznejših zapletov povečuje.

### **Stranski učinki in zapleti zdravljenja s PKMC**

PKMC je agresiven način zdravljenja s številnimi stranskimi učinki in zapleti. Prve dni se pojavi **slabost, bruhanje in inapetenca** ter **splošna oslabelost**. Večina bolnikov ima sočasno prizadeto sluznico prebavil z znaki **mukozitisa**, ki zahteva intenzivno analgetično terapijo z opioidi. V fazi aplazije kostnega mozga, ki traja 2-4 tedne, je potrebno zdravljenje **anemije in trombocitopenije** z obsevanimi pripravki koncentriranih in filtriranih eritrocitov in trombocitov. Zaradi **hude nevtropenije**, bolnike ogrožajo okužbe in prejemajo antibiotično, antivirotično in protiglivično zaščito. V primeru jasne okužbe, empirično zdravimo s širokospektralnimi antibiotiki, po 14 dnevnem obdobju kritične nevtropenije pa nastopi tudi velika verjetnost glivičnih okužb in takrat uvajamo tudi protiglivično terapijo.

Na tem mestu je potrebno poudariti, da je avtologna transplantacija povezana z bistveno manj zapleti, saj ne zahteva dodatne imunosupresivne terapije, ob njej pa tudi ni pojava reakcije presadka proti gostitelju, saj so transplantirane celice bolnikove lastne.

Pri **alogenični PKMC** pa se lahko že kmalu po transplantaciji pojavi **akutna reakcija presadka proti gostitelju** (ang. graft versus host disease, GVHD) in to navkljub preventivni imunosupresivni terapiji. V sklopu GVHD je lahko prizadet katerikoli organ, najpogosteje pa se kaže v prizadetosti kože, jeter, prebavil. Zdravljenje zahteva intenziviranje imunosupresivne terapije, sprva z visokimi odmerki metilprednisolona, kar še dodatno poveča dovzetnost bolnikov za okužbe, zlasti oportunistične (glivične, Pneumocystis carinii, CMV, toksoplazmoza).

Med zgodnje zaplete sodi še **venookluzivna bolezen jeter**, ki je posledica toksične poškodbe jetrnega endotela zaradi citostatikov in obsevanja in se kaže s povečanimi in bolečimi jetri, ascitesom, zlatenico in porastom telesne teže. Sistemska okvara kapilarnega endotela vodi v **sindrom prepuščanja kapilar**. Zaplete se lahko tudi z **difuzno alveolarno krvavitvijo**. V obdobju postopnega delovanja presadka lahko nastopi **sindrom delujočega presadka**, ki se kaže s povišano telesno temperaturo, kožnim izpuščajem, nekardiogenim pljučnim edemom s hipoksemijo, drisko ter porastom telesne teže. Če GVHD nastopi po stotih dneh od PKMC govorimo o **kroničnem GVHD**, ki prav tako prizadene kožo, jetra, prebavila, pa tudi oči, žleze slinavke, ustno sluznico in pljuča. Kadar beležimo GVHD, je to znak dobrega delovanja presadka in hkrati pomeni, da presadek verjetno deluje tudi protitumorsko in v tem primeru redko pride do ponovitve osnovne bolezni. Redko se zgodi, da pride do **zavrnitve presadka**. Vzrok zanj so imunske odzivni limfociti bolnika proti darovalčevim limfocitom, premajhno število darovalčevih KMC ali sočasne okužbe, zlasti z mielosupresivnimi virusi (parvo B19, HHV 6, HHV8). Med pozne zaplete zdravljenja prištevamo še: **neplodnost, prezgodnjo menopavzo pri ženskah in zmanjšano delovanje endokrinih žlez**. Tako po avtologni kot alogenični PKMC lahko pride tudi do **mikroangiopatične hemolitične anemije** (McGlave, 2009).

Bolnik po avtologni PKMC je izraziteje imunsko oslabiljen še približno pol leta po transplantaciji in v tem času prejema profilaktično protivirusno in protibakterijsko terapijo. Imunski sistem pa za obnovitev po preteku približno 2 let. Cilj zdravljenja je doseči popolno remisijo bolezni.

Bolnik po alogenični PKMC pa potrebuje imunosupresivno terapijo, ki jo ob rednih kontrolah prilagajamo glede na prisotnost GVHD. Poleg tega aktivno iščemo morebitne okužbe (CMV reaktivacije, glivične okužbe), ki jih intenzivno zdravimo. Najugodnejši izid zdravljenja z alogenično PKMC, pomeni odsotnost bolezni in zmeren GVHD, ki lahko celo dopušča postopno ukinitvev imunosupresivne terapije. Z ukinitvijo imunosupresivne terapije se poveča učinek presadka proti rakavim celicam.

Na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana letno opravimo okoli 100 transplantacij, od tega 20-30 alogeničnih (polovica nesorodnih), ostale so avtologne. Polovica bolnikov, pri katerih opravimo avtologno PKMC ima diseminirani plazmocitomom, preostali bolniki pa druge limfome, ki se praviloma zdravijo na Onkološkem inštitutu.

## **Zaključek**

Zdravljenje izbranih hematoloških bolnikov s PKMC v veliko boljši meri omogoča zazdravitev ali ozdravitev malignih krvnih bolezni, kot samo imuno in/ali kemoterapija. Ker je povezano z veliko stranskimi učinki in zapleti, se praviloma indicira pri relativno mlajših bolnikih, pri katerih ugotavljamo ustrezno psihofizično zmogljivost in odsotnost bolezni drugih organskih sistemov (srca, pljuč, ledvic).

## **Literatura**

1. Zver S. Avtologna in alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina. Littera picta; 2011:1355-60.
2. Provan D, Singer CR, Baglin T, Dokal I. Oxford Handbook of Clinical Haematology. Oxford University Press, Third Edition, 2011. Chapter 9:387-446.
3. McGlave P. Overview of Cell- and Immune-based Therapies. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H. Hematology basic principles and practice. Churchill Livingstone Elsevier, 2009. Chapter 98: 1555-9.

## **Zdravstvena nega hematoloških bolnikov z boleznijo presadka proti gostitelju**

**Polona Rihtaršič, dipl. m. s., Jasmina Halilović, TZN**

Univerzitetni klinični center, Ljubljana  
Klinični oddelek za hematologijo

### **Izvleček**

Bolezen presadka proti gostitelju (GVHD) je ena najpogostejših komplikacij alogenične presaditve kostnega mozga. Deli se na akutno in kronično obliko. GVHD omejuje uspešnost presaditve krvotvornih matičnih celic. Zdravi se s kortikosteroidi in imunosupresivi. Novejša metoda pa je zunajtelesna fotofereza. To je oblika afereze in fotodinamične terapije, v kateri se kri bolnika obdela zunajtelesno s fotoaktivnimi zdravili, ki se aktivirajo z ultravijolično svetlobo (metoxalen). Zdravstvena nega bolnika z GVHD je zelo specifična in individualna. Zdravljenje boleznij je izredno dolgotrajen in kompleksen proces, zato bolnik potrebuje psihično podporo ves čas zdravljenja. Pomembna je komunikacija bolnika in zdravstvenega osebja, ter bolnika in svojcev.

**Ključne besede:** *bolezen presadka proti gostitelju, ekstrakorporalna fotofereza, zdravstvena nega.*

### **Uvod**

Akutna bolezen presadka proti gostitelju je poleg zvečane dovzetnosti za okužbe glavni zaplet alogenične presaditve krvotvornih matičnih celic (PKMC). Nastane kot posledica aktivacije darovalčevih T-limfocitov proti antigenom prejemnika. Povprečna incidenca klinično pomembne GVHD (stopnja II–IV) je 40% (tabela 1). Nastanek je odvisen od več dejavnikov tveganja. Med njimi so pomembnejši: stopnja skladnosti antigenskega kompleksa HLA (humani levkocitni antigeni) med prejemnikom in darovalcem, neujemanje spola (posebej neugodno je ženska darovalka, moški prejemnik), stopnja predhodne darovalčeve aloimunizacije (transfuzije krvnih pripravkov, porodi), visoka starost prejemnika, način priprave pred presaditvijo (frakcionirano obsevanje celega telesa – TBI), okuženost z virusom citomegalije (CMV), pomemben pa je tudi vir matičnih celic (kostni mozeg ali matične celice, zbrane iz periferne krvi).

Poleg zdravil (imunosupresivov in kortikosteroidov) se za zdravljenje uporablja zunajtelesna fotofereza. To je oblika afereze in fotodinamične terapije, v kateri se kri obdela zunajtelesno s fotoaktivnimi zdravili, ki se aktivirajo z ultravijolično svetlobo (metoxalen). Celoten postopek traja približno 3 do 4 ure in vključuje levkoferezo, ločitev levkocitov in trombocitov (buffy coat) in nato ponovno infuzijo pacientu.

Zdravstvena nega pacienta z boleznijo presadka proti gostitelju je zelo kompleksen proces. V veliko primerih se spremeni bolnikov izgled in s tem samopodoba kar je se posebej stresno. Zdravstvena nega bolnika z GVHD temelji na aplikacije terapije, osebni higieni, opazovanju telesa, predvsem prizadetega dela ter komunikaciji. Do izboljšanja boleznij pride počasi ali pa sploh ne, zato se je potrebno s takšnim bolnikom veliko pogovarjati in mu vlivati upanje, saj v dolgotrajnem boju z boleznijo pogosto obupuje.

Za pripravo članka je uporabljena metoda dela pregled strokovne literature iz podatkovnih baz: Jupline, PubMed, Cinahl, Medline, Medscape, Google. Za iskanje literature so bile uporabljene ključne besede v slovenskem in angleškem jeziku: bolezen presadka proti gostitelju, graft versus host disease, zunajtelesna fotofereza, extracorporeal photopheresis, zdravstvena nega bolnika z boleznijo presadka proti gostitelju, nursing care of patients with graft versus host disease.

## Bolezen presadka proti gostitelju

Glede na pojavnost, klinične značilnosti in patopsihologijo, GVHD delimo na akutno oz. kronično (Blume in Thomas, 2000).

- **Akutna GVHD:** Pojavi se v prvih 100 dneh po transplantaciji. Med transplantiranimi pacienti, ki so HLA skladni z donorjem, jih med 20-50% doživi akutno zavrnitveno reakcijo. Incidenca se poveča pri nesrodnih alogeničnih transplantacijah. Najpogosteje pride do reakcije na koži, prebavnem traktu ter jetrih (Tabela 1):
  - **Reakcija na koži:** eritematozni makulopapularni izpuščaj, pogosto vključuje tudi dlani in podplate. Huda oblika lahko vključuje tudi luščenje kože.
  - **Reakcija na prebavilih:** krčevita bolečina v trebuhu ter velika količina vodene driske predstavlja bolezen GVHD na debelem in tankem črevesju. Pri hudih oblikah bolezni lahko postane driska tudi krvava ter možen je zaplet z ileusom.
  - **Reakcija na jetrih:** povišane vrednosti alkalne fosfataze in direktnega bilirubina ter neizrazito povišane transaminaze (Blume in Thomas, 2000).

Tabela 1: Stopnja prizadetosti organov pri akutni GVHD

STOPNJA PRIZADETOSTI	KOŽA	JETRA	GASTROINTESTINALNI TRAKT (GIT)
+	izpuščaj pod 25%	bilirubin 34 – 51 mmol/l	diareja nad 500 ml
++	izpuščaj 25 – 50%	bilirubin 52 – 102 mmol/l	diareja nad 1000 ml
+++	generalizirana eritrodermija	bilirubin 103 – 225 mmol/l	diareja nad 1500 ml
++++	bule, deskvamacije	bilirubin nad 225 mmol/l	kolike, lahko tudi ileus

Vir: (Blume in Thomas, 2000)

- **Kronična GVHD**

Običajno se pojavi več kot 100 dni po presaditvi kostnega mozga. Delimo jo na omejeno (Tabela 2) in razširjeno (Tabela 3) (Blume in Thomas, 2000).

Tabela 2: Stopnja prizadetosti organov pri omejeni kronični GVHD

PRIZADETI ORGAN	STOPNJA PRIZADETOSTI
KOŽA	prizadete je manj kot 50% površine
JETRA	zvišana aktivnost alkalne fosfataze in/ali povečana koncentracija bilirubina do 3x.

Vir: (Blume in Thomas, 2000)

Tabela 3: Stopnja prizadetosti organov pri kronični razširjeni GVHD

PRIZADETI ORGAN	STOPNJA PRIZADETOSTI
KOŽA	generalizirana ali lokalizirana prizadetost kože in/ali infiltrati
JETRA	prizadetost jeter, slika kroničnega hepatitisa, ciroza
ŽLEZE	prizadetost slinavk

Vir: (Blume in Thomas, 2000)

## **Zunajtelesna fotofereza**

Akutna in kronična GVHD omejuje uspešnost presaditve krvotvornih matičnih celic. Testirani so bili različni imunosupresivi in imunomodulatorji za zdravljenje kronične GVHD, med njimi tudi zunajtelesna fotofereza (ZTF), ki je navedena na seznamu ameriške Food and Drug Administration (FDA) in odobrena za zdravljenje kožnih manifestacij T-celičnega limfoma, kjer se je stopnja odziva precej visoka. Uspešnost ZTF so ocenili v majhnih kohortah bolnikov z akutnim in kroničnim GVHD. Pri akutni obliki GVHD neodzivno na steroide, na koži in jetrih, je bila stopnja odgovora več kot 60%, zlasti pri bolnikih z manj hudo obliko bolezni. Obstajajo dolgoletne izkušnje pri zdravljenju kroničnih GVHD. Pri bolnikih s kožnim, ustnim, očesnim, jetrnim, prebavilnim in pljučnim GVHD je odziv nad 50%. V ameriškem centru Anderson Cancer Center, so analizirali uspešnost ZTF pri 63-ih bolnikih, ki so imeli 3 linije imunosupresivov, vključno s takrolimusom in steroidi, ki preprečijo sočasne učinke s številnimi imunosupresivnimi zdravili. Stopnja odzivnosti je bila 59% (pri 37 bolnikih). Kompletno odzive so opazili pri 13 bolnikih. Najboljši odziv so ugotovili pri GVHD na koži, jetrih, ustni sluznici in na očeh. Vsi ti rezultati kažejo pomembno delovanje ZTF pri akutnih in kroničnih oblikah GVHD, ki bo zagotovo še predmet raziskav prospektivnih kontroliranih študiji (Curiel et al., 2006).

Owsianowski et al. (1994) so prvič poročali o izboljšanju kožnih sprememb, sklepnih kontraktur in Sjögrenovega sindroma pri enem bolniku s kronično GVHD po začetni ZTF, z normalizacijo CD4/CD8 razmerja. Rosetti et al. (1995) so poročali o naknadnem izboljšanju kožne, jetrne in pljučne GVHD pri otrocih ob zmanjšanju imunosupresivne terapije. V tej študiji so bolniki prejeli ZTF 2 dni vsake 3 tedne skupaj 6 mesecev, potem pa mesečno. Klinično izboljšanje pri bolnikih, ki se zdravijo z ZTF je omogočilo zniževanje imunosupresivnih zdravil in kortikosteroidov. Mediana časa do prekinitve zdravljenja s kortikosteroidi je bila 80 dni, mediana trajanja odziva po prekinitvi ZTF pa je 12 mesecev, pri čemer je 14% bolnikov doživelo ponovitve simptomov kronične GVHD po prekinitvi. Kljub potrebi po intravenskem dostopu za zdravljenje z ZTF v tej skupini imunokomprimiranih bolnikov ni bilo povečane stopnje okužb in ne povečane reaktivacije okužbe s CMV (Foss et al, 2002).

## **Zdravstvena nega bolnika z GVHD**

Pri bolniku z GVHD je potrebno najprej postaviti oceno stanja prizadetosti. Šele nato se skupaj v timu odločimo za ustrezno zdravljenje in lajšanje bolečin.

Pri bolniku z akutno in kronično obliko GVHD je izredno pomembno vsakodnevno izvajanje osebne higiene, posebej anogenitalne in ustne nege. Prav tako dnevna menjava posteljnega in osebne perila, tuširanje z nevtralnimi milom in večkratno spiranje ustne votline.

Pri črevesnem GVHD je poudarek na anogenitalni negi pri vsakem odvajanju, skrbimo, da je koža okoli anusa suha. Po potrebi ob pojavu bolečine, apliciramo hladne obkladke in analgetična mazila (Xylocain gel, Faktu gel). Bolnika opozarjamo na umivanje in razkuževanje rok, saj s tem preprečujemo možnost okužbe.

Pri kožnem GVHD se v akutni fazi najprej pojavi rdečina dlani in stopal. Zdravnik predpiše mazanje s kortikosteroidnimi mazili (Kuterid v belobazi), ali hlajenje dlani z ledenimi obkladki. V primeru, da akutna faza preide v kronično, je prizadeta koža celega telesa. Bolnikova koža postaja suha in se lušči (levi), nohti odstopajo. Poleg poostrene osebne higijene, kožo mažemo z mastnim mazilom (olivno olje, olje za dojenčke). Pri zelo hudi obliki, ko se pojavijo rane, bolnika umivamo s sterilno redestilirano vodo. Za oskrbo ran uporabljamo sodobne obloge za rane.

V primeru GVHD ustne sluznice pa je poudarek na večkratnem spiranju ustne votline. 6 - 10 krat obvezno pred in po vsaki jedi. Bolniki največkrat uporabljajo žajbljev in kamilični čaj, saj večina ustnih vod povzroča pekočo bolečino. Lahko mu pripravimo tudi raztopini z dodatkom sode bikarbone, ki blagodejno učinkuje na ustno sluznico. Bolniki imajo težave z uživanjem trde hrane, zato se prehranjujejo s tekočo dieto. Ves čas zdravljenja je zelo pomembno uživanje energijskih napitkov, saj bolnik na ta način najlažje zadosti potrebo po dnevnemu vnosu kalorij. V primeru močnih bolečin tudi ob požiranju tekočine, mu ponudimo protibolečinska mazila za peroralno uporabo, ki jih uporabi nekaj minut pred obrokom (Gelclair, 1% lidokain v orobazi, triamcinolom). V skrajnem primeru, ko uživanje hrane v katerikoli obliki ni več možno, se odločimo za parenteralno prehrano.

Večkrat dnevno opazujemo bolnika in prizadeti del, ter ga spodbujamo pri nadaljevanju zdravljenja in izvajanja redne osebne higijene. Zdravljenje GVHD je izredno dolgotrajen proces in bolnik potrebuje psihično podporo ves čas zdravljenja. Pomembna je komunikacija bolnika in zdravstvenega osebja, ter bolnika in svojcev. Zaradi spremenjenega videza, je motena bolnikova samopodoba. Potrebna sta razumevanje in potrpežljivost, bolniki so največkrat podvrženi obupu in apatiji. Na našem oddelku smo usmerjeni v celostno obravnavo bolnika, tako fizično, kot psihično.

## **Zaključek**

Alogenična PKMC je v povprečju v 60% varen in učinkovit način zdravljenja akutnih levkemij pri odraslih. S pojavom GVHD pa se glede na intenzivnost bolezni, lahko učinkovitost PKMC zmanjša. Zaradi sprememb, največkrat po koži, jetrih in prebavilih, se lahko kakovost življenja bolnika zelo spremeni – zniža. Lahko pride celo do življenjske ogroženosti. V takšnih primerih je zelo pomembna vloga zdravstvenih delavcev, ki bolnika zdravijo in negujejo. Ključno vlogo ima dobro poučen bolnik, ki opazuje spremembe na telesu, za njih ustrezno skrbi in o njih poroča zdravstvenemu osebju. V primeru da pacient skrbi za sebe ni več sposoben, ga nadomestijo zdravstveni delavci, ki mu z ustrezno komunikacijo vlivajo zaupanje in so ob njem, ko jih potrebuje.

## **Literatura**

1. Blume KG, Thomas ED (2000). A review of autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 6: 1-12.
2. Curiel D, Hosing C, Saliba R, Shpall EJ, Andelini P, Popat U, Donato M, Champlin R (2006). Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? *Biol Blood Marrow Transplant* 2 (1): 37-40.
3. Foss FM, Gorgun G, Miller KB (2002). Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 29 (9): 719-25.
4. Kumar A (2011). Using Extracorporeal Photopheresis in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease. <http://www.onclive.com/publications/obtn/2011/june-2011/using-extracorporeal-photopheresis-in-the-treatment-of-graft-versus-host-disease/2> <30.3.2012>

## Fotofereza

**Stanislava Žlebnik, dipl. m. s.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
Oddelek za preskrbo s krvjo

### Izvleček

Fotofereza je oblika zdravljenja s fototerapijo. Zunajtelesna fotofereza je postopek, kjer se preko leukaferoze zbranim mononuklearnim celicam doda fotoaktivna snov (8-metoksipsoralen). Temu sledi obsevanje pripravka z ultravijoličnimi A žarki ter neposredna reinfuzija na ta način obdelanih celic v krvni obtok bolnika. Sam postopek traja v celoti 3 ure in se za enega bolnika izvaja dva dni zapored v presledku 14 dni, dvakrat mesečno.

**Ključne besede:** *fototerapija, bolnik, citaferaza, koncentrat enojedrnih celic*

### Uvod

Fototerapija je ustaljen način zdravljenja različnih kožnih bolezni, tako benignih kot malignih npr. psoriaza, kožni neHodginovi T celični limfomi, kot tudi drugih bolezenskih stanj, ki so povezana s transplantacijo organov in tkiv. Ker so limfociti T povzročitelji reakcije presadka proti gostitelju (GVHD) pri presaditvi krvotvornih matičnih celic in zavrnitvene reakcije pri presaditvi organov, prihaja ta oblika zdravljenja v poštev pri GVHD in zavrnitvenih reakcijah. Z uporabo zunajtelesne fotofereze (ZTF) pri akutnem GVHD se bistveno skrajša zdravljenje z imunosupresivnimi zdravili in prispeva k izboljšanju preživetja bolnikov. ZTF pa je prav tako učinkovita pri zdravljenju kronične GVHD, predvsem oblike s prizadetostjo kože (Pretnar, 2008).

Zunajtelesna fotofereza (ang. extracorporal photopheresis - ECP) je oblika celične imunomodulatorne terapije, ki vključuje ločevanje plazme, bogate z levkociti, njihovo izpostavljanje fotosenzibilizatorju (8- metoksipsoralen) in ultravijoličnim A žarkom zunaj telesa, nato pa njihovo vračanje v krvni obtok. Psoralen se veže na DNK v limfocitih in pod vplivom UV žarkov povzroči celično okvaro- apoptozo. Poleg direktno toksičnega učinka na limfocite pa ima še imunomodulirajoče učinke, ki še niso popolnoma prepoznani. Pri transplantiranih bolnikih so tako po zdravljenju z ZTF ugotovili porast števila donorskih imunoregulatornih limfocitov in zmanjšanje števila efektorskih limfocitov (Pretnar, 2008).

Prvi so ZTF uporabili dermatologi Edelson in sod. leta 1987 v zdravljenju eritrodermične oblike kožnega T-celičnega limfoma. Leto dni kasneje je ameriška agencija za hrano - Food and Drug Administration (FDA) odobrila uporabo ZTF v zdravljenju te bolezni. V naslednjih letih pa so ZTF uporabili za zdravljenje več kot 20 različnih bolezenskih stanj (Pavlović, Demšar et al., 2008). Z raziskovanjem, tehničnimi dosežki, zbiranjem izkušenj in znanjem, se je ta način zdravljenja prenesel v Evropo in ima vidne rezultate v svetovnem merilu (Greinix, Knobler, 2012).

## **Postopek zunajtelesne fotofereze**

Za ZTF bolnik ne potrebuje posebnih priprav, je pa potrebno upoštevati nekatere smernice, indikacije in tudi kontraindikacije tovrstni terapiji.

Med najbolj pogostimi indikacijami za ZTF je kronična oblika bolezni presadka proti gostitelju (GvHD), posebej spremembe na koži in sluznicah. Če bolnik ni odziven na sistemski kortikosteroid ali če je odvisen od kortikosteroida ter ima prizadetega najmanj enega izmed naslednjih organov: koža, sluznice (usta ali oči) in jetra.

Omejitve za ZTF so predvsem: občutljivost na psoralene, fotosenzitivnost, nosečnost, trombocitopenija ( $< 20 \times 10^9/L$ ), driska ( $> 1 L$  dnevno), aktualna okužba, število nevtrofilcev  $< 1 \times 10^9/L$ . ZTF pa se uporablja seveda tudi za zdravljenje akutne GVHD, ki je hitro napredujoča ali razširjena (Pavlović, Demšar et al., 2008).

Za sam postopek cifaferoze, oziroma prvega dela celotnega postopka ZTF, kjer se zbere koncentrat enojedrnih (mononuklearnih) celic se uporabljajo ustrezni celični ločevalci. V tem delu je potrebno poudariti pomen optimalnega venskega dostopa, saj je za zagotavljanje tehnične izvedbe postopka s celičnim ločevalcem potrebno vzpostaviti ustrezen pretok, ki omogoča brezhibno delovanje samega aparata in s tem uspešnost izvedbe postopka. Postopek afereze traja približno dve uri. Zbranemu koncentratu MNC se nemudoma po koncu afereze doda psoralen (8- metoksipsoralen). Neposredno zatem pa se pripravek vstavi v poseben aparat, kjer se obseva z UVA žarki. Ta del postopka traja okrog 45 minut. Po obsevanju je pripravek pripravljen za takojšnjo reinfuzijo bolniku. Opisani postopek se izvaja pri vsakem bolniku na 14 dni in sicer dva dni zapored.

## **Zaključek**

Z potrditvijo varnosti in učinkovitosti zdravljenja z ZTF so nove raziskave in dognanja dosegla tudi druga področja bolezni in stanj. Revmatoidni artritis, sistemska skleroza, sistemski lupus, zavrnitev presajenih solidnih organov, posebno akutnih zavrnitev srca in pljuč. Najbolj izstopajoča indikacija v tem času pa je zdravljenje in preprečevanje akutne kot tudi kronične oblike GVHD, posebej pri spremembah na koži in sluznici (Greinix, Kobler, 2012).

Na splošno je ZTF izjemno varna oblika zdravljenja, saj je izredno koristno pri bolnikih, pri katerih so alternativni načini zdravljenja zelo toksični (Pavlović, Demšar et al., 2008).

## **Literatura**

1. Greinix H, Knobler R, Extracorporeal photopheresis. Berlin. Boston: De Gruyter;2012: 1-11
2. Pretnar J. Zbornik predavanj 18. sestanka Hematološkega društva laboratorijskih tehnikov, Kranjska Gora, 3. in 4. oktober 2008: 8.
3. Pavlović M, Demšar J, Bremec T, Tlaker- Žunter V. Zbornik predavanj 18. sestanka Hematološkega društva laboratorijskih tehnikov, Kranjska Gora, 3. in 4. oktober 2008: 9.

## Odvzem granulocitov s postopkom afereze

**Stanislava Žlebnik, dipl. m. s.**  
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
Oddelek za preskrbo s krvjo

### Izvleček

Pripravek granulocitov je eden zadnjih možnih terapevtskih ukrepov pri bolnikih s hudo nevtropenijo, ki se ne odzivajo na predhodno antibiotično in antimikotično zdravljenje širokega učinkovanja. Ker je zdravljenje z granulociti v zadnjih letih zaradi hkratne uporabe ravnega dejavnika za celice granulocitne vrste dostopnejše in predvsem bolj učinkovito, se v klinični praksi vse pogosteje uporablja. Za medicinske sestre je zato zelo pomembno, da poznajo sodobna stališča o tej komponenti krvi. V prispevku je predstavljen postopek zbiranja, obdelave in zdravljenja s pripravkom granulocitov.

**Ključne besede:** *odvzem granulocitov, afereza, pripravek granulocitov, bolnik, zdrav darovalec.*

### Uvod

Nevtrofilni granulociti (NG) nastajajo z diferenciacijo in dozorevanjem krvotvornih matičnih celic v kostnem mozgu. Kljub temu, da se tam zadržujejo različno dolgo, znaša stalna zaloga NG v kostnem mozgu približno  $9 \times 10^9$  NG/kg telesne mase (TM) posameznika. Poglavitna vloga NG je sodelovanje v obrambi človeškega telesa pred okužbami. NG lahko ubijejo bakterije, glive in plesni s fagocitozo, s sproščanjem mikrocidnih snovi v okolico ter s sproščanjem nukleinskih kislin in beljakovinskih verig. Pri hudih oblikah nevtropenije (število NG je manjše od  $0,5 \times 10^9/L$ ), ki spremljajo mieloablativno zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali brez nje ter pri nekaterih funkcionalnih motnjah NG, se pojavljajo klinično težke, za bolnika pogosto usodne okužbe. Zdravimo jih z antibiotiki in antimikotiki ter z ustrezno podporno nego. V primeru neodzivnosti na omenjeno zdravljenje lahko uporabimo transfuzijo pripravkov granulocitov (PG). PG so komponenta krvi, pripravljena z aferezo iz krvi enega darovalca, ki vsebuje funkcionalne NG, suspendirane v plazmi. V pripravku so v manjšem deležu kot v polni krvi prisotni tudi eozinofilni in bazofilni granulociti ter ostale krvne celice, kar moramo upoštevati pri transfuziji. Zato so to komponento krvi poimenovali PG kljub temu, da se uporablja kot vir NG za nadomestno zdravljenje s transfuzijami (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011).

Pri pisanju prispevka je uporabljena strokovna literatura na tem področju in arhiv ZTM (Oddelek za preskrbo s krvjo - Odsek za citafereze)

### Teoretična izhodišča

Z odkritjem afereznega postopka leta 1965 se je ponudila možnost zbiranja večjega števila NG tudi od povsem zdravih darovalcev, kar je povečalo klinično uporabo transfuzij PG. Raziskave so pokazale, da je tovrstno zdravljenje lahko učinkovito, vendar je bila njihova dokazna moč slaba zaradi praviloma majhnega števila bolnikov, ki so bili pogosto tudi

skrbno izbrani, zaradi heterogenosti vključitvenih meril, razlik v sestavi PG in drugih pomanjkljivosti. Temu obdobju je sledilo obdobje ponovnega zmanjšanja klinične uporabe zaradi izboljšanega zdravljenja z novimi antibiotiki in antimikotiki ter vse bolj učinkovitega podpornega zdravljenja. K zmanjšanju transfuzij PG so pripomogli tudi relativno pogosti, celo življenje ogrožajoči neželeni učinki (predvsem na dihalih) po transfuziji PG in nezadostna klinična učinkovitost zdravljenja zaradi majhnega števila in v pripravkih. V drugi polovici devetdesetih let prejšnjega stoletja so odkrili rastni dejavnik (G-CSF, filgrastim) za celice granulocitne vrste. Odkritje ravnega dejavnika in njegovo klinično uporabo je zmanjšalo potrebo po transfuzijah PG, saj se je skrajšalo trajanje hude nevtropenije po zdravljenju bolnikov s citostatiki (z akutnimi oblikami levkemije in mielodisplastičnim sindromom, zdravljeni s presaditvijo krvotvornih matičnih celic). Konec dvajsetega stoletja pa so transfuzije PG ponovno postale aktualne. Stimulacija zdravih darovalcev z rastnim dejavnikom G-CSF namreč omogoča zbiranje velikega števila NG med posameznim afereznim postopkom in s tem njihov večji ter predvsem učinkovitejši terapevtski odmerek (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011).

### **Izvajanje granuloferez na Zavodu RS za transfuzijsko medicino**

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM) se zbiranje PG z granulocitaferezami izvaja že od leta 1981. V obdobju 1990–2010 je bilo opravljenih 214 zbiranj PG, kar je v povprečju nekaj več kot 10 zbiranj na leto. Povečano povpraševanje po PG je opaziti od leta 2008 (26 zbiranj), kar sovpada z načinom stimulacije darovalcev s kombinacijo ravnega dejavnika G-CSF in kortikosteroidov. Največ zbiranj (31) je zabeleženih leta 2010. V letu 2011 je bilo opravljenih 37 zbiranj, v letu 2012 pa 84 zbiranj. Vsi postopki granuloferez so bili opravljeni od leta 2010 na aparatu Cobe Spectra, pred letom 2010 pa na aparatu CS 3000. Cilj zdravljenja s transfuzijami PG je, da se z dnevnimi odmerki NG doseže vrednost NG v periferni krvi bolnika, ki je večja od  $0,5 \times 10^9/L$ . To je tudi mejna vrednost, ki označuje hudo (kritično) nevtropenijo. Če je le mogoče, je zelena ciljna vrednost NG čim bližje normalnim vrednostim NG. Tako se doseže primerna zaščita bolnikov pred okužbami, ki se sicer vedno pojavljajo v obdobju podaljšane kritične nevtropenije. Če je tovrstno zdravljenje indicirano, je bolnika potrebno zdraviti s transfuzijami NG vsak dan z odmerkom  $1,5\text{--}3,0 \times 10^8$  NG na kg telesne mase (TM) odraslega prejemnika. Zdravljenje traja najmanj štiri zaporedne dni oz. dokler se ne vzpostavi zadostna lastna bolnikova granulopoeza (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011). Priporočeni odmerek je večji od  $1 \times 10^{10}$  granulocitov na dan (oziroma  $1,5\text{--}3,0 \times 10^8$  NG/kg TM/dan pri odraslem prejemniku).

### **Izbor in priprava ustreznega darovalca PG**

Na ZTM je način pridobivanja granulocitnega pripravka vezan na postopek afereze oziroma na granulocitaferezo pri zdravih darovalcih, predhodno stimuliranih z rastnim dejavnikom in kortikosteroidnimi zdravili (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011). Pridobitev in stimuliranje ustreznega zdravega darovalca pa velikokrat ni preprosto. Darovalci PG so sicer lahko zdrave osebe, stare od 18 do 65 let, ki izpolnjujejo splošna merila za dajanje krvi in krvnih komponent. V obdobju pred stimulacijo z G-CSF so bili darovalci PG praviloma krvodajalci, ki so že dajali komponente krvi z aferezami (npr. s trombocitaferezo ali plazmaferezo) in so bili postopka vajeni. Možnost nastanka nekaterih zapletov ob odvzemu je bila tako manjša, uspešnost zbiranja pa večja. V obdobju

stimulacije darovalcev z G-CSF pa so praviloma darovalci sorodniki oz. prijatelji ali znanci potencialnega prejemnika. Za dajanje PG jih je namreč lažje motivirati kot naključne darovalce, ker želja pomagati sorodniku ali prijatelju odtehta tveganje, povezano z neželenimi učinki, ki lahko nastanejo po prejemanju ravnega dejavnika. Možne darovalce zagotovijo sorodniki na predlog hematologa, ki jih napoti na določitev krvne skupine AB0 in RhD ter Kell ter anti-CMV. Na podlagi izvidov se izberejo ustrezni darovalci (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011). Če je prejemnik PG kandidat za zdravljenje z presaditvijo alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC), sodijo v izbor nesorodni darovalci (prijatelji ali znanci prejemnika).

Na podlagi znane krvne skupine AB0 in RhD prejemnika so izbrani potencialni darovalci, ki imajo krvno skupino, ki je identična ali skladna s krvno skupino prejemnika. Skladnost v krvnih skupinah AB0 in RhD med prejemnikom in dajalcem mora biti zagotovljena zaradi sorazmerno velikega deleža eritrocitov v PG. Zato so načela AB0 in RhD skladnosti med prejemnikom in dajalcem PG enaka kot pri transfuziji eritrocitov. Pred izbiro so darovalci vedno informirani o vseh vidikih darovanja PG in možnih zapletih, nujno je pridobivanje ciljne anamneze glede kroničnih bolezni, predvsem bolezni srca, obtočil ali dihal kot tudi rakavih bolezni in bolezni, ki se prenašajo s krvjo.

Izbrani darovalci so testirani na prisotnost označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo v predpisanem obsegu (HbsAg, anti-HCV, anti-HIV, sifilis protitelesa, HBV DNA, HCV DNA, HIV RNA) že dan pred afereznim postopkom, kar omogoča takojšnjo izdajo PG in izogib shranjevanju PG po odvzemu zaradi čakanja na izsledke testiranj in posledičnemu propadanju NG v pripravku. Pri zdravljenju s transfuzijami PG se upošteva tudi skladnost CMV med prejemnikom in darovalcem. Ta kriterij pa seveda še dodatno osiromaši število ustreznih darovalcev. Ne nazadnje pa je potrebno pri izbiri darovalca vključiti kriterij ustreznega venskega pristopa in pri tem pomisliti na možne zaplete ter ustrezno poučiti darovalca. Za samo izvedbo granulofereze in nemoten potek postopka je potrebno vzpostaviti zadovoljive pretoke, kar pa je ob nezadovoljivih venskih pristopih včasih zelo težko ali celo nemogoče. Zato je potrebna dobra koordinacija med celotnim timom in poznavanje vseh kriterijev za primerne darovalca GP.

Darovalec lahko prejme G-CSF na hematološki kliniki, lokalni zdravstveni ustanovi ali pa se ga usposobi za samodajanje na domu. Ker se zbiranje NG z aferzo izvaja zjutraj, je priporočeno, da si darovalec vbrizga G-CSF v odmerku 5–10 µg/kg sc. (Neupogen® 300–480 µg sc.) okoli 22.00 ure zvečer, dan pred aferzo. Hkrati darovalec vzame tudi tableto metilprednizolona (Medrol®, 48 mg), ki ga predpiše hematolog. Tako je zagotovljena tudi časovna ustreznost aplikacije imenovanih zdravil v okviru dvanajst ur pred aferetskim postopkom, kar omogoči najboljši možen izplen in s tem kvaliteten PG.

Pred zbiranjem je darovalec seznanjen z vsemi dejstvi, ki so povezana s postopkom:

- pregledan je izpolnjen medicinski vprašalnik o sedanjem zdravstvenem stanju in preteklih boleznih, o potovanjih v tujino ter tveganem vedenju,
- opravljen je hemogram in koncentracija hemoglobina v krvi bolnika,
- izmerjen krvni tlak in srčna frekvenca.

Po preverjanju izsledkov določanja označevalcev bolezni, ki se prenašajo s krvjo, se izbira darovalca zaključi z njegovo podpisano izjavo o poučenosti in s pristankom na odvzem (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011). Darovalec mora biti predhodno seznanjen tudi s

pomembnostjo pravilne prehrane neposredno pred odvzemom, zadostnim pitjem tekočin dan pred odvzemom in zagotovljenim spanjem in počitkom en dan pred odvzemom.

Granulofereza je postopek, pri katerem se NG ločujejo od ostalih krvnih celic s centrifugiranjem. Praviloma se med levkocitaferezo v aferezni napravi obdela okrog šest litrov darovalčeve krvi, kar je odvisno od teže darovalca na katero je vezan njegov volumen krvi in traja približno dve uri. Kot sedimentacijsko sredstvo se na Zavodu za transfuzijsko medicino uporablja 6% Volulyte z dodanim natrijevim citratom. Med darovanjem PG lahko nastanejo neželeni učinki, ki so povezani z dajanjem stimulacijskih zdravil ali z granulocitafereznim postopkom. Pomembno je pravočasno prepoznavanje in ukrepanje ob neželenih učinkih tovrstnega posebnega odvzema. Stimulacija z G-CSF lahko povzroči bolečine v kosteh in mišicah, glavobol in nespečnost. Učinki so kratkotrajni, praviloma blage do zmerne stopnje in darovalcev ne odvrnejo od ponovnega darovanja.

Neželeni učinki, ki so povezani z granulocitaferezo, zabeleženi na Zavodu za transfuzijsko medicino so bili prehodnega značaja in niso zahtevali prekinitve odvzema. Ob venepunkciji lahko nastane hematoma, periferna tromboza, poškodba živca. Med samim odvzemom lahko pride do hipokalcemije, ki je posledica dodajanja natrijevega citrata (»citratna reakcija«). Zaradi sprememb znotraj žilnega volumna se lahko pojavi tudi sinkopa različnih stopenj. HES kot sedimentacijsko sredstvo ima prostorninski učinek na sistemski krvni obtok, zato lahko pri darovalcu nastopi glavobol ali periferni edemi, povzroči pa lahko tudi alergijske odzive (Domanovič, Cukjati, Zver, 2011). Slednji sicer na zavodu za Transfuzijsko medicino niso bili zabeleženi a vendar so izvajalci o morebitnih tovrstnih neželenih učinkih dobro poučeni.

### **Transport in izdaja GP**

Po končanem postopku je potrebno PG pripraviti za čimprejšnjo izdajo in transport na kliniko, saj je kakovost pripravka najboljša neposredno po pripravi. Skladno delovanje v zdravstvenem timu omogoči, da bo bolnik dobil transfuzijo PG v čim krajšem možnem času. Shranjevanje na temperaturi +22°C ne sme presegati 24 ur. Z ionizirajočim obsevanjem se dodatno dvigne kvaliteta GP. V pripravku se tako inaktivirajo viabilni limfociti, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku bolezni presadka proti gostitelju. PG je potrebno obsevati neposredno pred izdajo in sicer od 25 Gy do 50 Gy, transport pa mora potekati v okviru ustrezne temperature v ustrezni izolirani transportni torbi (Guide, 2009).

### **Zaključek**

Transfuzije granulocitov so način zdravljenja. Njegov učinek se je povečal z uporabo rastnega dejavnika za stimuliranje zdravih darovalcev. Tako je bolniku zagotovljena večja količina terapevtskega odmerka PG. Izbor ustreznega darovalca je zahteven postopek v katerem so vključeni sorodniki in celoten zdravstveno negovalni tim, ki mora delovati usklajeno in natančno upoštevati pomembnost vseh kriterijev za izbor darovalca, njegovo informiranost o postopku in možnih neželenih učinkih, stimulacijo, tehnično izvedbo postopka afereze in izdajo, transport ter končno transfundiranje kakovostnega pripravka granulocitov bolniku.

### **Literatura**

1. Domanovič D, Cukjati M, Zver S. Pripravki granulocitov in priporočila za njihovo uporabo Zdrav Vestn 2011; 80: 439–450.
2. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 15th ed. Strasbourg: European Directorate for the quality of Medicine & Healthcare; 2009: 261-6.

## OPRANI ERITROCITI

**Maja Draksler, dipl. m.s.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
Oddelek za preskrbo s krvjo

### Izvleček

Oprani eritrociti so pridobljeni iz polne krvi s centrifugiranjem in z odstranitvijo plazme ter oprani v izotonični raztopini. Oprane eritrocite uporabljamo predvsem za bolnike ki imajo protitelesa proti plazemskim beljakovinom še posebej anti IgA in za bolnike, pri katerih je prišlo do hudih alergičnih reakcij v zvezi s transfuzijo krvi. Oprane eritrocite lahko pripravimo z ročno in avtomatsko metodo. Prispevek predstavlja pripravo opranih eritrocitov z obema metodama. Odstranjevanje celokupnih beljakovin in protiteles IgA z obema metodama je učinkovito, saj se vrednosti po pranju močno zmanjšajo.

**Ključne besede:** *oprani eritrociti, IgA, Haemonetics ACP 215, alergične reakcije*

### Uvod

Osnovna naloga vsake transfuzijske ustanove je pripraviti ustrezno komponento krvi za vsakega bolnika. Nekateri bolniki imajo v krvi protitelesa, ki otežujejo iskanje primerne krvne komponente za transfuzijo.

Oprani eritrociti so krvna komponenta, pridobljena iz polne krvi s centrifugiranjem in z odstranitvijo plazme ter oprani v izotonični raztopini. To je suspenzija eritrocitov, iz katere je odstranjena večina plazme, levkocitov in trombocitov.

### Indikacije za pranje eritrocitov

Pranje eritrocitov je indicirano:

- pri bolnikih s protitelesi proti plazemskim beljakovinom, še posebej anti IgA,
- pri bolnikih pri katerih je prišlo do hudih alergijskih reakcij v zvezi s transfuzijo krvi,
- za zmanjšanje rizika nastanka reakcije na določene komponente v plazmi in antikoagulatno oz. ohranitveno raztopino,
- za zmanjšanje rizika nastanka visoke vrednosti kalija v krvi bolnika,
- pri transfuziji materinih eritrocitov novorojenčku, da preprečimo hemolitično bolezen novorojenčka,
- za zmanjšanje rizika nastanka s transfuzijo povezano akutno pljučno poškodbo (ang. transfusion related acute lung injury - TRALI).

### Priprava opranih eritrocitov

Izhodišče za pripravo opranih eritrocitov so eritrociti v ohranitveni raztopini z odstranjenimi levkociti (koncentrirani eritrociti filtrirani - KEF).

Oprane eritrocite se lahko pripravi na dva načina. Ročno, z dodajanjem fiziološke raztopine in centrifugiranjem (ta postopek se večkrat ponovi) se odstrani iz enote eritrocitov čim več celokupnih beljakovin in drugih primesi. Postopek se lahko izvede tudi z avtomatsko metodo. Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani se v ta namen uporablja aparata Haemonetics ACP 215.

### ***Ročno pranje eritrocitov***

Pri ročnem pranju eritrocitov se najprej vrečko KEF sterilno poveže z vrečko, v kateri je fiziološka raztopina (0,9% NaCl), ohlajena na +4°C. Eritrocitom se dolije 200 – 300 ml te raztopine. Nato se vrečka sterilno zavari in k vrečki privari še prazna sterilna vrečka, v katero se kasneje odlije dodano fiziološko raztopino in preostanek plazme (supernatant). S centrifugiranjem se pospeši sesedanje / ločevanje eritrocitov in dodanih tekočin. Po centrifugiranju se z avtomatskim ločevalcem iztisne vso tekočino nad eritrociti v privarjeno vrečko. Ta postopek se ponovi še dvakrat. Na koncu se opranim eritrocitom dolije ustrezno količino fiziološke raztopine, izračunano po formuli za pridobitev želenega hematokrita. Uporabnost opranih eritrocitov je omejena na največ 24ur (SOP – P.P -09).

Mednarodna priporočila omejujejo uporabo opranih eritrocitov pri odprtem sistemu po odstranitvi ohranitvene raztopine na 24 ur. Čas uporabe opranih eritrocitov se lahko podaljša z uporabo sterilnega povezovalca cevk in dodajanjem ohranitvene raztopine (salina – adenin- glukoza – manitol (SAG-M)) opranim eritrocitom pri ročnem pranju (Grabmer et al., 2006).

### ***Avtomatska metoda za pripravo opranih eritrocitov***

Tehnologija zamrzovanja in pranja eritrocitov je na voljo že nekaj desetletij. Združba Haemonetics je prva razvila popolnoma avtomatsko napravo zaprtega sistema ACP 215 za glicerolizacijo (pred zamrzovanjem) in deglicerolizacijo (po zamrzovanju) ter pranje eritrocitov. Aparat ACP 215 je majhen in lahek ter nudi transfuzijskim ustanovam popolno procesno kontrolo v zaprtem sistemu (Popovsky, 2001).

Sistem Haemonetics ACP 215 ima več funkcij in ena od njih je spiranje eritrocitov. Proces spiranja je avtomatski in spere večino beljakovin, ki so vsebovane v plazmi. Na koncu se lahko eritrocitom doda fiziološko raztopino (uporabnost 24 ur) ali ohranitveno raztopino SAG-M (uporabnost 14 dni). Set za spiranje eritrocitov je za enkratno uporabo, steriliziran z etilen oksidom. Set ima vgrajeno črpalko za črpanje raztopine in 0.2 µm bakterijski filter. Ta filter preprečuje vstop neželenih snovi v set in s tem ohranja funkcionalno zaprt sistem po spojitvi vrečke z raztopino. To omogoča podaljšano shranjevanje eritrocitov pri temperaturi od +2°C do +6°C (Navodila)

Za pranje eritrocitov se izbere KEF s hematokritom med 50% in 80%. Z napravo za sterilno povezovanje cevk se poveže vrečko KEF z rdečo cevko na setu za pranje eritrocitov. V programu se izbere pranje z ali brez ohranitvene raztopine SAG-M. Sledi namestitev seta, vnos kode izvajalca, nastavitve ustreznih parametrov (teža, vhodni hematokrit), priključitev raztopine in nato se prične pranja eritrocitov. Aparat avtomatsko spira eritrocite štirikrat. Glede na vhodno težo in vhodni hematokrit pa opravi en ali dva

ciklusa. Ko aparat zaključi postopek, izvajalec iz vrečke z opranimi eritrociti iztisne zrak in jo sterilno odvari.

## Rezultati pranja eritrocitov

Primerjavo učinkovitosti pranja eritrocitov z fiziološko in ohranitveno raztopino, z ročno metodo in z aparatom Haemonetics ACP 215 prikazuje Tabela 1.

Tabela 1: Rezultati pranja eritrocitov z ročno metodo in z aparatom Haemonetics ACP 215

	Hb (%)	Preostale beljakovine (%)	Preostali IgA (%)
Ročna metoda (fiziološka raztopina)			
MIN	92,8%	8,4%	0,2%
MED	95,0%	15,7%	1,1%
MAX	96,4%	35,5%	2,7%
Avtomatska metoda (fiziološka raztopina)			
MIN	90,4%	12,2%	0,1%
MED	93,3%	19,5%	0,6%
MAX	99,0%	28,6%	15,9%
Avtomatska metoda (ohranitvena raztopina (SAG-M))			
MIN	90,3%	12,7%	0,8%
MED	94,0%	19,7%	5,6%
MAX	100,0%	36,9%	20,7%

Odstranjevanje celokupnih beljakovin s pranjem je bilo učinkovito, saj se je njihova vsebnost v opranih eritrocitih močno zmanjšala. Vsebnost celokupnih beljakovin po pranju je bila pod 0,5 g na enoto, ki jo kot zgornjo dopustno mejo določajo evropska priporočila (Guide, 2008)).

Vrednosti IgA po pranju eritrocitov so se močno znižale in so bile odvisne od vhodne vrednosti. V novejši literaturi in evropskih priporočilih ni navedene mejne vrednosti za vsebnost IgA po pranju. V evropskih priporočilih starejšega datuma je določena meja za vsebnost IgA <0,2 mg na enoto opranih eritrocitov (Priporočilo, 2002).

Rezultati pranja eritrocitov z aparatom Haemonetics ACP 215 so pokazali, da je metoda učinkovita. Vsebnost celokupnih beljakovin se je zmanjšala močno pod mejo, ki jo določajo evropska priporočila. Rezultati po pranju so se gibali od 0,07 do 0,18 g na enoto. Pri ročni metodi so dobljene vrednosti po pranju primerljive z vrednostmi pri avtomatski metodi. Vsebnost IgA po pranju se je prav tako močno zmanjšala glede na vhodne vrednosti. Rezultati so se pri avtomatski metodi gibali med 0,03 in 0,23 mg na enoto, medtem ko so bili rezultati pri ročni metodi še nekoliko boljši, okoli 0,03 g na enoto. Sklepamo, da je v tem primeru ročna metoda celo bolj učinkovita, kljub temu pa ima avtomatska metoda veliko prednosti pred ročno.

Slabosti ročne metode so v tem, da pretirano rokovanje s krvjo povečuje riziko nastanka človeške napake in večja je možnost bakterijske okužbe. Postopka ni možno standardizirati (Grabmer et.al., 2006).

Slabost aparata ACP 215 je ta, da ni možno vplivati na hematokrit končnega produkta. Tako smo pri avtomatskih postopkih dobili precej različne vrednosti hematokrita v primerjavi z ročno metodo, kjer smo lahko določili želeni hematokrit.

Dobljeni rezultati pranja eritrocitov so primerljivi z rezultati raziskav v tujini. Vrednosti po pranju so zadovoljile zahteve, ki jih določajo nova evropska priporočila. V primeru, ko je indikacija za pranje eritrocitov anafilaktična transfuzijska reakcija pri bolniku zaradi pomanjkanja IgA in prisotnost anti-IgA protiteles dokazana, je potrebno dati transfuzijo opranih eritrocitov počasi in bolnika dobro opazovati.

## Zaključek

Pri bolnikih ki prejemajo velike količine krvnih pripravkov in imajo oslabljen imunski sistem, je zagotavljanje ustrezne komponente krvi zahtevnejše. V takih primerih so v veliko pomoč sodobne tehnike in metode priprave krvnih komponent. Usklajenost in sodelovanje v negovalnem in zdravstvenem timu je podlaga za kakovostno opravljeno delo.

## Literatura

1. European Committee on Blood Transfusion (2008). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 14th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 133–5
2. Grabmer C, Holmberg J, Popovsky M et al. (2006). Up to 21-day banked red blood cells collected by apheresis and stored for 14 days after automated wash at different times of storage. *Vox Sang.* 90 (1):40–4.
3. Navodila za uporabo Haemonetics ACP215. Medicotehna Ljubljana, Zadobrovska cesta 42a.
4. Popovsky MA (2001). Frozen and washed red blood cells: new approaches and applications. [Transfus Apher Sci.](#) 25 (3): 193–4.
5. Priporočilo o pripravi, uporabi in zagotavljanju kakovosti komponent krvi. 8 izdaja. Ljubljana: Zavod RS za transfuzijo krvi in Informacijsko dokumentacijski center Sveta Evrope pri Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani; 2002.
6. SOP – P.- 09 (2012). Priprava koncentriranih eritrocitov opranih v fiziološki raztopini – ročno pranje.

## **Inaktivacija patogenov v trombocitih**

**Maja Draksler, dipl. m.s.**

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana  
Oddelek za preskrbo s krvjo

### **Izvleček**

Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani uporabljamo za inaktivacijo patogenov v trombocitnih pripravkih sistem z amotosalenom in UV žarki. V ta namen uporabljamo aparat za fotoinaktivacijo INTERCEPT. Amotosalen (psoralen) pod vplivom UV-A žarkov reagira s pirimidinskimi bazami nukleinskih kislin in tvori kovalentne vezi, ki nepovratno preprečijo podvajanje nukleinskih kislin patogenov in prepisovanje v proteine.

**Ključne besede:** *amotosalen, virusi, trombocitni pripravki*

### **Uvod**

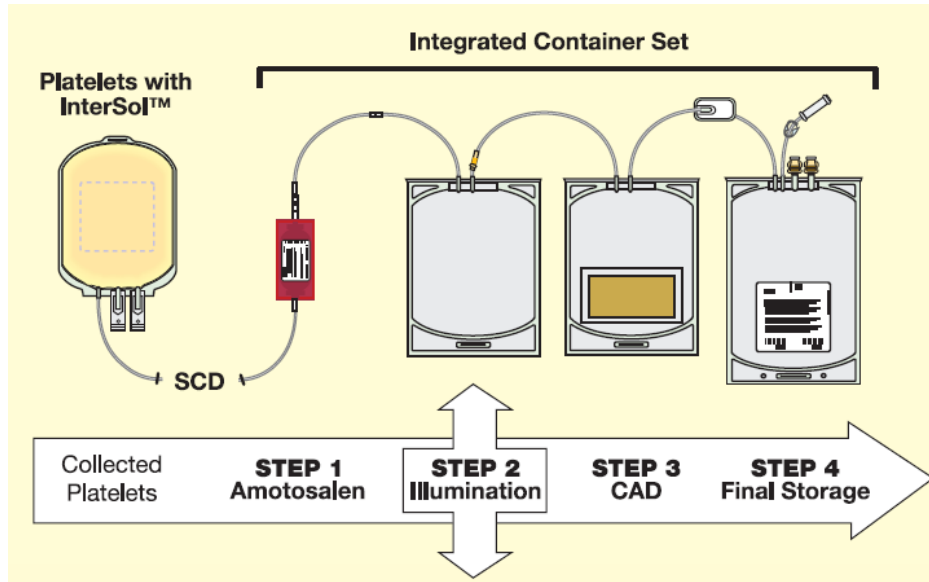
Inaktivacija patogenov v krvnih komponentah je proaktivni pristop k preprečevanju prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzijo. Postopki inaktivacije plazme s topilom in detergentom se uporabljajo že več kot dve desetletji. Večina novejših tehnik z uporabo aktivnih molekul in svetlobe spremeni nukleinske kislin virusov, bakterij, parazitov in levkocitov in s tem onemogoči njihovo pomnoževanje. Nekatere tehnike učinkovito inaktivirajo tudi levkocite in s tem zmanjšajo pogostost neželenih učinkov, ki jih ti povzročajo. Dober sistem za inaktivacijo patogenov mora imeti čim širši spekter delovanja na različne vrste patogenov, hkrati pa v čim manjši meri okvarjati celične in plazemske sestavine. Postopek mora imeti dovolj varen toksikološki profil, ne sme povzročati nastajanja neoantigenov in mora zagotoviti klinično učinkovitost transfundiranih komponent. Danes so v Evropi v uporabi štirje sistemi za inaktivacijo patogenov v krvnih pripravkih: sistem topilo/detergent (S/D), metilensko modrilo (MB) in vidna svetloba, amotosalen in UVA žarki, riboflavin in UV žarki. Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani od leta 2008 uporabljamo za inaktivacijo patogenov v trombocitnih pripravkih sistem z amotosalenom in UV žarki (Milojković in Cukjati, 2012).

### **Metoda inaktivacije patogenov z uporabo amotosalena in UVA žarkov**

Aparat INTERCEPT (Cerus, Evropa) omogoča inaktivacijo patogenov tako v plazemskih kot trombocitnih pripravkih. Obdeluje se posamezne enote trombocitov ali zlitje manjšega števila enot plazme. V razvoju je sistem, ki bo omogočal tudi inaktivacijo patogenov v eritrocitih. Zaradi delovanja na ravni nukleinskih kislin se učinkovito inaktivirajo tudi dajalčevi levkociti. Amotosalen (psoralen) pod vplivom UVA žarkov reagira s pirimidinskimi bazami nukleinskih kislin in tvori kovalentne vezi, ki nepovratno preprečijo podvajanje nukleinskih kislin patogenov in prepisovanje v proteine (Milojković in Cukjati, 2012).

## Virusna inaktivacija trombocitov

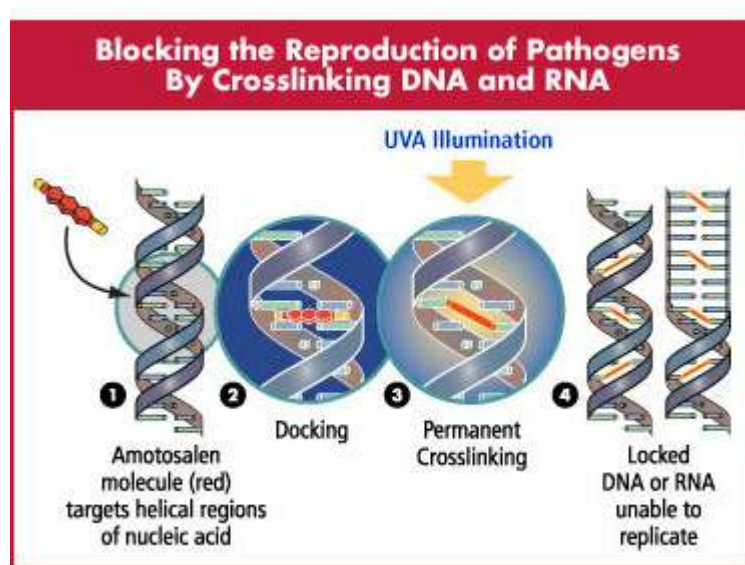
Vhodna komponenta so trombociti v ohranitveni raztopini InterSol pripravljeni iz zlitja petih enot buffy coata (TFB) ali pripravljene s postopkom afereze od enega dajalca (KTF). Vrečko s pripravkom sterilno povežemo s sistemom vrečk za fotoinaktivacijo (Slika 1) (Kotnik, Draksler, 2012).



Slika 1: Shema postopka virusne inaktivacije

Vir: [http://www.interceptbloodsystem.com/files/AABB\\_2012/AABB\\_2012\\_Lof\\_CERUS.pdf](http://www.interceptbloodsystem.com/files/AABB_2012/AABB_2012_Lof_CERUS.pdf)

Trombocite najprej pretočimo v prvo vrečko sistema, kjer se pomešajo s fotosenzibilizatorjem amotosalenom. V aparatu INTERCEPT se pripravek nadzorovano obseva z UVA žarki tako, da molekule dodanega amotosalena nepovratno kovalentno povežejo vijačnici nukleinskih kislin in tako preprečijo pomnoževanje virusnih DNA oz. RNA in prepisovanje pri sintezi proteinov (Slika 2) (Kotnik in Draksler, 2012).



Slika 2: Shema preprečevanja pomnoževanja DNA oz. RNA

Vir: <http://www.interceptbloodsystem.com/product-overview/amotosalen-mechanism-of-action.html>

Po obsevanju se pripravek pretoči v drugo vrečko sistema, v kateri je adsorbent, ki veže preostali (nevezani) amotosalen iz pripravka. Postopek je končan po 4-ih do 16-ih urah ko pripravek pretočimo v tretjo vrečko sistema, namenjeno končnemu shranjevanju do uporabe. Naziva krvnih komponent, ki ju z opisanim postopkom dobimo, sta (Kotnik in Draksler, 2012):

- Trombociti, pridobljeni iz polne krvi, zlitje, odstranjeni levkociti, obdelani s psoralenom (TBP)
- Trombociti, afereza, odstranjeni levkociti, obdelani s psoralenom (TAP)

S postopkom virusne inaktivacije dosežemo (Kotnik in Draksler, 2012):

- inaktivacijo patogenov (virusi, bakterije, paraziti),
- inaktivacijo levkocitov - prepreči GVHD (alternativa gama obsevanju), manjša sinteza
- proteinov, manjša pogostnost aloimunizacije,
- nadomestimo iskanje CMV neg. dajalcev, bakteriološko kontrolo, gama obsevanje,
- daljši čas shranjevanja trombocitnih pripravkov (do 7 dni),
- učinkovitost in varnost TBP in TAP je primerljiva z ostalimi pripravki trombocitov.

Kontraindikacija za uporabo TBP oz. TAP je alergija na amotosalen oz. psoralene. Prav tako niso primerni za novorojenčke med fototerapijo hiperbilirubinemije.

## Zaključek

Virusna inaktivacija trombocitov je pomemben postopek pri zagotavljanju varne transfuzije. Dodatno zmanjša možnost prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzijo. Kljub temu pa je ohranjena kakovost celičnih in plazemskih sestavin.

## Literatura

1. Milojković A, Cukjati M (2012). Inaktivacija patogenov v krvnih komponentah: tehnologije, trenutno v uporabi in trendi v prihodnosti. Zdrav Vestn. 82 supl 2: II-289-98.
2. Kotnik M, Draksler M (2012). Odvzem krvi za transfuzijo, predelava krvi v krvne komponente. V: Priprava shranjevanje, distribucija in transfuzija krvnih komponent. Ljubljana: Zavod RS za transfuzijsko medicino, 5-12.
3. Evaluation of in Vitro Platelet Function in INTERCEPT. Dostopno na: [http://www.interceptbloodsystem.com/files/AABB\\_2012/AABB\\_2012\\_Lof\\_CERUS.pdf](http://www.interceptbloodsystem.com/files/AABB_2012/AABB_2012_Lof_CERUS.pdf), 25. 4. 2013
4. Amotosalen Mechanism of Action. (INTERCEPT Blood System) Dostopno na: <http://www.interceptbloodsystem.com/product-overview/amotosalen-mechanism-of-action.html>, 25. 4. 2013



V imenu članov Strokovne sekcije medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v anesteziologiji, intenzivni terapiji in transfuziologiji se zahvaljujem vsem podpornikom 47. strokovnega seminarja.

Dejan Doberšek  
Predsednik strokovne sekcije

Strokovno srečanje so podprli:

Abbott d.o.o.  
Bormia d.o.o.  
Conmed d.o.o.  
Interpart d.o.o.  
MARK MEDICAL d.o.o.  
Medias International d.o.o.  
Medis d.o.o.  
Medicotehna d.o.o.  
Meditrade d.o.o.  
ORIONPHARMA d.o.o.  
Pharmamed Mado d.o.o.  
Pulmodata d.o.o.  
RAM 2 d.o.o.  
Sanolabor d.d.  
SPES d.o.o.  
Thomy F.E d.o.o.  
Tosama d.o.o.  
3M ( East) AG

*» In srce človeško se razširi v objem, ki sega od enega konca sveta do drugega ter vsemu,  
kar je kadarkoli bilo, je in bo, radostno reče: HVALA!«*

Jože Urbanija

misel iz knjige »Zgodbe Tomaža Slovenca«