

Klinički centar "Novi Sad", Novi Sad
 Institut za interne bolesti, Klinika za hematologiju¹
 Institut za medicinska istraživanja, Beograd
 Odeljenje za eksperimentalnu hematologiju²
 Vojnomedicinska akademija, Institut za transfuziologiju, Beograd³

Pregledni članak
 Review article
 UDK 612.119.084:615.22
 DOI 10.2298/MPNS0702042U

MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE PERIFERNE KRVI - BIOLOGIJA, AFEREZNO PRIKUPLJANJE I KRIOKONZERVACIJA

PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS - BIOLOGY, APHERESIS COLLECTION AND CRYOPRESERVATION

Ivana UROŠEVIĆ¹, Bela BALINT^{2,3} i Stevan POPOVIĆ¹

Sažetak - Hematopoeza je kontinuirani, složen i dinamični proces u kome od malog broja najprimitivnijih pluripotentnih matičnih ćelija hematopoeze nastaju različite populacije (pluripotentne i određene za više ili samo jednu krvnu lozu) progenitorskih ćelija i njihovi potomci do zrelih krvnih ćelija. Brojne studije su utvrdile uticaj kompleksne mreže interaktivnih citokina u preživljavanju, sazrevanju i proliferaciji hematopoeznih matičnih i progenitorskih ćelija. Matične ćelije hematopoeze mogu da obezbede repopulaciju kostne srži posle njenog primarnog i/ili mijeloablativnog oštećenja zahvaljujući velikom potencijalu samoobnavljanja, kapacitetu da proliferišu i diferenciraju u potomstvo svih krvnih loza. To je osnova njihove terapijske primene, kao što je "klasična" transplantacija ćelija kostne srži, čime se obezbeđuje kompletna i dugotrajna rekonstitucija hematopoeze. Sasvim novo polje kako bazičnih istraživanja, tako i kliničkih studija predstavljaju ispitivanja plastičnosti, odnosno "trans-diferencijacije" najprimitivnije populacije adultnih matičnih ćelija. Naime, u određenim okolnostima one mogu dati ćelije potomke drugih ćelijskih linija - zavisno od toga u koje je tkivo izvedena njihova implantacija ("ćelijska terapija"). Eksperimenti na životinjskim modelima i prve kliničke studije ukazuju na mogućnost intrakoronarne primene matičnih ćelija hematopoeze (poreklom iz kostne srži ili periferne krvi) u infarktenu zonu miokarda što može da ubrza oporavak srca posle infarkta. I pored ovoga, postavljaju se pitanja optimalne kolekcije krvnih progenitora/ćelija, selekcije, skladištenja i kliničke primene. Cilj ovog revijalnog rada je da se pregledom savremene inostrane i domaće literature prikažu osnovna saznanja o podeli i fiziologiji matičnih ćelija hematopoeze, protokoli njihovog afereznog prikupljanja, prečišćavanja i kriokonzervacije.

Ključne reči: Matične ćelije hematopoeze; Hematopoeza; Krioprezervacija; Biološka terapija; Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze

Biologija matičnih ćelija

Pomoću samoobnavljanja, totipotentne, multipotentne i/ili pluripotentne matične ćelije hematopoeze (MCH) održavaju konstantnost sopstvene populacije u kostnoj srži u uslovima fiziološke ravnoteže hematopoeze, a do određene granice i u uslovima kada je ova ravnoteža narušena. Proliferacijom i diferencijacijom iz primitivnih pluripotentnih MCH nastaju najpre ćelije koje su i dalje pluripotentne, ali sa unekoliko redukovanim potencijalom samoobnavljanja. Iz ćelija opredeljenih za dve ili samo jednu lozu, koje međutim, imaju veoma skroman ili nikakav kapacitet samoobnavljanja, diferencijacijom nastaju morfološki prepoznatljiviji progenitori koji daljom diferencijacijom i sazrevanjem daju zrele ćelije [1-3].

Postojanje MCH je ostalo hipotetično sve do početka šezdesetih godina dvadesetog veka, kada je na osnovu funkcionalnih osobina dokazano njihovo postojanje. Reč je o klasičnim eksperimentima Tilla i McCullocha u kojima su miševima (ozračenim sa smrtnom dozom) ubrizgavane ćelije kostne srži drugih miševa [4]. Uočeno je da se u slezini ozračenih miševa pojavljuju čvorovi, tj. kolonije hematopoeznih progenitora svih loza, što je potvrdilo da je MCH, iz koje nastaje kolonija, pluripotentna. Pošto morfološki nije bilo moguće prepoznati i definisati ovu ćeliju, upotrebljen je termin "jedinica koja formira koloniju u slezini" (*Colony Forming Unit-Spleen* - CFU-S) [4-9]. Rane kolonije (npr. one

koje nastaju osmog dana), tzv. CFU-Sd8 nastaju iz "zrelijih" ćelija, a kasne kolonije (CFU-Sd12 i CFU-Sd14) iz primitivnijih MCH. Međutim, pokazano je da CFU-Sd14 nisu najprimitivnija populacija MCH. Naime, dokazano je da postoje ćelije koje uopšte nije moguće registrovati na osnovu stvaranja kolonija. Ova populacija pluripotentnih MCH označena je kao pre-CFU-S i ima veoma izraženu sposobnost da kompletno repopuliše kostnu srž - što je i moguće određivati "testom repopulisanja kostne srži" (*Marrow Repopulating Ability* - MRA) [8-11]. Rezultati dobijeni testom MRA ukazuju na zadovoljavajući oporavak ove primitivne populacije pluripotentnih MCH po odmrzavanju, posebno kada su kriokonzervisani, programirano po protokolu koji podrazumeva kompenzaciju oslobođene toplote fuzije [12,13]. Danas se MRA ćelije grubo dele na kratkotrajno repopulišuće, tj. relativno manje primitivne (*Short Term Repopulating Cells* - STRCs) i dugotrajno repopulišuće, tj. primitivnije (*Long Term Repopulating Cells* - LTRCs) [14].

Kada je reč o dokazivanju MCH kod ljudi, najpre su razvijeni testovi *in vitro* za opredeljene progenitore granulomonocitopoeze (*Colony Forming Unit-Granulocyte-Monocyte* - CFU-GM), a potom za zrele ili primitivnije opredeljene progenitore eritrocitopoeze (*Burst* ili *Colony Forming Unit-Erythroid* - BFU-E ili CFU-E), megakariocitopoeze (*Burst* ili *Colony Forming Unit-Megakaryocyte* - BFU-Mk ili CFU-Mk), kao i za najzreliju kategoriju pluripotentnih ćelija (*Colony Forming Unit-Granu-*

Skraćenice

MČH	- matične ćelije hematopoeze
CFU-S	- Colony Forming Unit- Spleen
MRA	- Marrow Repopulating Ability
CFU-CM	- Colony Forming Unit-Granulocyte-Monocyte
CFU-E	- Colony Forming Unit-Erythroid
BFU-Mk	- Burst Forming Unit Megakariocyte
CFU-Mk	- Colony Forming Unit Megakariocyte
CFU-GMM	- Colony Forming Unit-Granulocyte
MNC	- mononuklearne ćelije
PK-MČH	- matične ćelije hematopoeze iz periferne krvi
rHuG-CSF	- rekombinantni humani faktor rasta granulocitopoeze
LVL	- Large Volume Leukapheresis
DMSO	- dimetil sulfoksid
GvHD	- Graft versus host disease
GvL	- Graft versus leukemia efect

lyocyte-Erythroid-Monocyte-Megakariocyte - CFU-GEMM) [15-17].

Uvođenje testova za kultivisanje MČH čoveka, značajno je doprinelo tumačenju pojedinih hematoloških poremećaja, kao i napretku u dijagnostici i praćenju efekata terapije [18,19]. Prepoznavanje i određivanje primitivnijih pluripotentnih MČH u kostnoj srži čoveka omogućeno je razvojem dugotrajnih kultura kostne srži. Iz ovog sistema je izveden test kojim je moguće odrediti veoma primitivne pluripotentne MČH na osnovu uspostavljanja dugotrajne kulture *in vitro* [21]. Osim ovog pristupa, koji je u suštini analogan *in vivo* repulacionom testu (MRA) kod miša, razvijen je i test koji se zasniva na sposobnosti pluripotentnih MCH da *in vitro* formiraju kolonije koje nastaju iz ćelija sa visokim proliferativnim kapacitetom (*High Proliferative Potential Colony Forming Cells* - HPP-CFCs) [21].

Ekspanzija populacije MČH u *ex vivo* uslovima zahteva primenu različitih faktora rasta hematopoeze u dugotrajnim kulturama [22,23]. Rezultati dugogodišnjeg istraživanja u ovoj oblasti, stvoreni uslovi za terapijsku primenu *ex vivo* ekspanzovanih MČH, a prvi rezultati primene ovog metoda za obezbeđivanje dovoljnog broja vijabilnih MCH (visoki stepen klonogenosti) za autolognu transplantaciju ohrabrujući su [24].

Najprimitivnije pluripotentne MČH čoveka se jedino mogu dokazati *in vivo* na osnovu repulacije hematopoeze imunodeficientnih miševa [25, 26].

Veliki napredak u izučavanju MČH postignut je razvojem tehnologije imunomagnetskog prečišćavanja ćelija (pozitivna i/ili negativna selekcija upotrebom ćelijskih sortera) i uvođenjem metoda obeležavanja membranskih antigena ćelija monoklonskim antitelima [27,28]. Ovim postupcima je moguće koncentrisati različite "subpopulacije" MCH do hiljadu puta, što je omogućilo bolji terapijski učinak, ali i neposredniji eksperimentalni pristup pojedinim kategorijama MCH [29-31].

Sasvim novo polje bazičnih istraživanja i kliničkih studija predstavljaju ispitivanja plastičnosti, odnosno "trans-diferencijacije" najprimitivnije populacije adultnih MČH. Naime, u određenim okol-

nostima MČH mogu dati ćelije potomke drugih ćelijskih linija - zavisno od toga u koje je tkivo izvedena njihova implantacija ("ćelijska terapija") [32]. Tako, eksperimenti na životinskim modelima i prve kliničke studije ukazuju na mogućnost intrakoronarne primene MCH (poreklom iz kostne srži ili periferne krvi) u infarktenu zonu miokarda što može da ubrza oporavak srca posle infarkta. Ima i domaćih saopštenja o rezultatima takve "ćelijske terapije" koja su pokazala da je implantacija MCH (iz autologne kostne srži) u infarktenu zonu miokarda bezbedna i izvodljiva. Dalje praćenje će pokazati da li ova terapija utiče korisno na remodeliranje srčanog mišića i da li postoje neke odložene komplikacije, kao što su aritmogenost i sklonost ka restenozi [32-34].

Aferezno prikupljanje, prečišćavanje i kriokonzervacija MCH

Hematopoeza se tokom embrionalnog razvoja odvija u žumančanoj kesici, posle toga u jetri fetusa, a na kraju u kostnoj srži odraslog čoveka. MCH su prisutne ne samo u umbilikalnoj nego i u perifernoj krvi odraslih. Produkt mononuklearnih ćelija (MNC), sa prisutnim MČH, može biti prikupljen aferezom posle mobilizacije matičnih ćelija u perifernu krv. Transplantacijom MCH iz periferne krvi (PK-MČH) želi se postići brza (rapidna), ali dugotrajna i kompletna rekonstitucija hematopoeze [35-44].

Koristi i nedostaci ovog modaliteta lečenja, u odnosu na transplantaciju kostne srži mogu biti procenjeni na osnovu: a) kinetike rekonstitucije hematopoeze; b) dužine funkcionisanja transplantata; c) pojave i težine komplikacija transplantacije i d) rizika udruženih sa izvođenjem postupaka prikupljanja matičnih ćelija. Uslovi za uspešnu transplantaciju stvoreni su sticanjem novih saznanja iz transplantacijske biologije (posebno imunologije), usavršavanjem postupaka mobilizacije i afereznog prikupljanja, kao i prečišćavanja (procesiranje i sortiranje) i kriokonzervacije ćelija, odnosno obezbeđenjem efikasne suportivne terapije produktima krvi [45-48].

Generalno, primenom PK-MČH bitno se skraćuje period pancitopenije i smanjuju zahtevi za suportivne transfuzije trombocita i/ili granulocita zbog brže rekonstitucije hematopoeze posle transplantacije. Osim toga, pri aferznom prikupljanju MCH, davaoci nisu izloženi rizicima od infekcije kostiju multiplim punkcijama i aspiracijama, opšte anestezije i rada u operacionoj sali. Mišljenja u vezi sa učestalosti komplikacija kod bolesnika tretiranih MCH iz kostne srži ili periferne krvi nisu sasvim ujednačena.

U praktičnom radu, zavisno od vrste transplantacije, mobilizacija MCH u perifernu krv postiže se: a) primenom citostatika (na primer, ciklofosamid 4-7 g/m²) ili polihemioterapije (autologa); b) ubrizgavanjem rekombinantnog humanog faktora rasta granulocitopoeze (rHuG-CSF) u dozi 5-10 μg/kgtm

(alogeni), odnosno 10-16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (autologna) ili c) njihovom istovremenom upotrebom (autologa) [49, 50]. Postupak citafereze je u potpunosti automatizovan, podrazumeva korišćenje standardizovanih protokola za prikupljanje ćelija. Međutim, po potrebi, a sa ciljem povećanja prinosa PK-MCH i/ili redukcije volumena ćelijske suspenzije (što je od značaja za kriokonzervaciju), moguće je modifikovati program. Pri tome, najčešće upotrebljeni antikoagulantno-konzervišući rastvor je ACD ili CPD (koji sadrže citrat), iako bi bilo potrebno istraživanja usmeriti ka iznalaženju nekog pogodnijeg rastvora za te svrhe [49].

Što se tiče najpogodnijeg termina prikupljanja PK-MCH (*harvest*), u alogenoj situaciji afereza se izvodi petog dana od početka primene rHuG-CSF. Optimalni termin prve afereze kod autologih transplantacija moguće je odrediti na osnovu vrednosti broja leukocita ($5-10 \times 10^9/\text{L}$), odnosno broja $\text{CD}34^+$ ćelija (oko $30-50/\mu\text{L}$) u perifernoj krvi bolesnika [50,51].

Prikupljanjem PK-MCH postoji i potreba za kvantifikacijom MNC, CFU-GM i $\text{CD}34^+$ ćelija. Većina autora smatra da je potrebno da broj MNC bude $2-4 \times 10^8/\text{kg}$, broj CFU-GM ne manji od $20-50 \times 10^4/\text{kg}$ i broj $\text{CD}34^+$ ćelija $3-5 \times 10^6/\text{kg}$ primaoca [50,52-54]. Iako su opšteprihvaćene, ove vrednosti samo sa rezervom mogu garantovati kompletnu i dugotrajnu rekonstituciju hematopoeze. Inače, za postizanje prikazanog prinosa ćelija potrebno je da: a) volumen procesirane krvi jednom aferezom iznosi dva do tri volumena cirkulišuće krvi, pri čemu procedura traje 4-5 sati i b) da ukupni volumen procesirane krvi (1-3 procedure) iznosi 20-25 L [49,50]. Ukoliko je volumen procesirane krvi jednom aferezom veći od 3-3,5 volumena cirkuliše krvi, reč je o "leukoferezi velikog volumena" (*Large Volume Leukapheresis* - LVL) [19]. Prema domaćim podacima [50,51] izvođenjem jedne procedure LVL u oko 90% slučajeva bilo je moguće obezbediti dovoljan prinos PK-MCH.

Volumen suspenzije MCH, a posebno broj eritrocita u njoj treba da budu maksimalno redukovani. Ukoliko je kostna srž izvor MCH, procesiranje je imperativno. Izvođenje spomenutih postupaka je posebno važno kada se radi o ABO inkompatibilnoj transplantaciji ili ako se izvodi kriokonzervacija MCH. Time se količina potrebnog krioprotektora (dimetil-sulfoksid - DMSO), odnosno liza eritrocita po odmrzavanju ćelijske suspenzije svode na najmanju količinu, tj. stepen [49-51].

Kao što je već spomenuto, u nekim situacijama potrebno je smanjiti broj neželjenih ćelija (alogenih limfocita ili tumorskih ćelija) u suspenziji PK-MCH. Redukcija broja limfocita T u suspenziji MCH se izvodi radi prevencije GvHD, ali treba reći da njihovo otklanjanje može rezultovati i otežanim prihvatanjem kalema ili izostankom efekta GvL.

Ovaj postupak prečišćavanja je označen kao *purging*, a postiže se upotrebom imunomagnetne tehnike - tzv. pozitivna (koncentrisanje MCH) i/ili negativna (redukcija broja "štetnih" ćelija) selekcija ćelija. Nakon takve selekcije prinos $\text{CD}34^+$ treba da iznosi 50-60%, a njihova procentualna zastupljenost u finalnom produktu oko 80-90% [49]. Inače, prve procedure pozitivne selekcije PK-MCH (upotrebom monoklonskih antitela specifičnosti anti- $\text{CD}34^+$ i aparature *Isolex 300i* izvedene su i u našoj zemlji - pri tome, prinos $\text{CD}34^+$ ćelija je iznosio 62% a njihova zastupljenost u finalnom produktu (tzv. pozitivna frakcija MCH) 82% [50].

Potrebno je ubrizgavati PK-MCH neposredno po prikupljanju preko centralnog venskog katetera. Po potrebi one mogu biti skladištene u tečnom stanju najduže do 48-72 sata na temperaturi od $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (alogene) ili u zamrznutom stanju dugotrajno, tj. do terapijske primene (autologe). Dugotrajno skladištenje MCH podrazumeva njihovu kriokonzervaciju, koju čine sledeći postupci: a) izlaganje ćelija krioprotektoru (ekvilibracija); b) programirano (uz kompjuterizovanu kontrolu dinamike hlađenja) ili neprogramirano zamrzavanje; c) skladištenje u zamrznutom stanju i d) odmrzavanje (uz eventualno otklanjanje krioprotektora iz odmrznutog produkta) i sledstvena reinfuzija ćelija bolesniku [50,51,54].

Većina autora smatra da je optimalna brzina zamrzavanja $1-2^\circ\text{C}/\text{min}$ uz kompenzaciju oslobođene toplote fuzije za vreme transformacije tečne u čvstu fazu [51,54]. Međutim, ima i mišljenja da nije neophodno programirano zamrzavanje [55,56]. Što se tiče krioprotektora, svi poznati protokoli kriokonzervacije MCH koriste DMSO - ali u nejednakim koncentracijama (5% ili 10% rastvor) - sam ili u kombinaciji sa hidroksietilnim skrobom (HES - 6% rastvor) [49]. Odmrzavanje preparata HSPC treba vršiti rapidno, u vodenom kupatilu, na temperaturi $37 \pm 3^\circ\text{C}$. Preparat treba bolesniku (re)infundovati odmah, a najkasnije o roku od nekoliko minuta po odmrzavanju.

Oporavak MNC po odmrzavanju treba da bude oko 70-90%, a vijabilnost oko 80-90%, dok broj CFU-GM ne manji od 70-90% u odnosu na vrednosti pre zamrzavanja, da bi se moglo govoriti o kvalitetno izvedenoj kriokonzervaciji [52-54].

Zaključak

Za obezbeđivanje veće terapijske efektivnosti transplantacija matičnih ćelija hematopoeze iz periferne krvi potrebna su dalja izučavanja njihove biologije, usavršavanje protokola mobilizacije, afereze i prečišćavanja ćelija, vladanje postupcima kriokonzervacije (prvenstveno za autologe transplantacije) i kontrola kvaliteta (kvantifikacija $\text{CD}34^+$ ćelija i kolonija) produkta matičnih ćelija hematopoeze.

Literatura

1. Cronkite EP, Daniak N, McCaffrey RP, Palek J, Quesenberry PJ, editors. Hematopoietic stem cell physiology. New York: Alan R Liss; 1985.
2. Gidali J, Fecher I, Antil S. Some properties of the circulating haematopoietic stem cells. *Blood* 1974;43:573-80.
3. Lajtha LG, Pozzi LV, Schofield R, Fox M. Kinetic properties of haematopoietic stem cells. *Cell Tissue Kinet* 1969;2:39-49.
4. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 1961;14:213-21.
5. Siminovich L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony forming cell among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:192-202.
6. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.
7. Ivanović Z, Milenković P. The seceding efficiency of normal and hereditarily anemic (b/b) rat bone marrow colony forming units-spleen as determined in a "Rat to Mouse" assay. *Stem Cells* 1995;13:666-70.
8. Lord BI, Testa NG. The hematopoietic system: structure and regulation. In: Testa NG, Gale RP, editors. Hematopoiesis: long-term effects of chemotherapy and radiation. New York: Marcel Dekker; 1988. p. 1-25.
9. Schofield R. The pluripotent stem cell. *Clin Haematol* 1979;8:221-37.
10. Hodgson GS, Bradley TR, Martin RF, Sumner M, Fay P. Recovery of proliferating haematopoietic cells after killing by hydroxyurea. *Cell Tissue Kinet* 1975;8:51-60.
11. Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature* 1979;281:381-2.
12. Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Jovčić G, Stojanović N, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of MRA. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:613-9.
13. Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Vojvodić D, Taseski J, Malešević M. Evaluation of cryopreserved murine and human hematopoietic stem and progenitor cells designated for transplantation. *Vojnosanit Pregl* 1999;56:577-85.
14. van de Sluis JP, Baert MRM, van Beurden CA, Phloemache RE. Evaluation of in vivo and in vitro repopulation assays for murine haematopoietic stem cells. *Comp Hematol Intern* 1992;2:117-22.
15. Fauser AA, Messner HA. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Blood* 1978;52:1243-8.
16. Fauser AA, Messner HA. Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood* 1979;53:1023-7.
17. Iscove NN, Sieber F, Winterhalter KH. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow. Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-Concavalin A. *J Cell Physiol* 1974;83:309-20.
18. Patel VP, Lodish HF. Loss of adhesion of murine erythroleukemia cells to fibronectin during erythroid differentiation. *Science* 1984;224:996-8.
19. Ruvidić R, Jovčić G, Biljanović-Paunović Lj, Stojanović N, Mijović A, Pavlović-Kentera V. Myelopoiesis and erythropoiesis of bone marrow cells cultured in vitro in patients recovered from aplastic anemia. *Scand J Hematol* 1985;35:437-44.
20. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragovska W, Lansdorp PM. Characterisation and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563-70.
21. Me Niece IK, Bertoucello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *Int J Cell Cloning* 1990;8:146-51.
22. Brugger W, Moecklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD3⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin 1 beta, IL-6, IL-3, interferon-gamma and erythropoietin. *Blood* 1993;81:2579-84.
23. Herschler R, Brugger W, Luft T, Frez T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD3⁺-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994;84:2898-903.
24. Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 1995;333:283-7.
25. Kamel-Reid S, Dick JE. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 1988;242:827-34.
26. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nature Med* 1996;2:1329-37.
27. Dreger P, Viehmann K, Steinmann J, Eckstein V, Mueller-Ruchholtz W, Loeffler H, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: comparison of T cell depletion strategies using different CD3⁺ selection systems or CAMPATH-1. *Exp Hematol* 1995;23:147-54.
28. Slaper-Cortenbach ICM. Processing of hematopoietic stem cells: purging or selection. *Vox Sang* 1994;67(Suppl 3):185-6.
29. Comenzo RL, Malachowski NE, Miller KB, Erban JK, Schenkein DP, Desforjes JF, et al. Large-volume leukapheresis for collection of mononuclear cells for hematopoietic rescue in Hodgkin's disease. *Transfusion* 1995;35:42-5.
30. Fetcher S, Brugger W, Mertelsmann R, Kanz L. The clinical role of hematopoietic growth factors in peripheral blood progenitor cell transplantation. *Vox Sang* 1994;67(Suppl 3):43-7.
31. Schneider JG, Crown JP, Wasserheit C, Kritiz A, Wong G, Reich L, et al. Factors affecting the mobilization of primitive and committed hematopoietic progenitors into the peripheral blood of cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:877-84.

32. Balint B. Stem cells - unselected or selected, unfrozen or cryopreserved: marrow repopulation capacity and plasticity potential in experimental and clinical settings. Proceedings of the II Congress of Macedonian society of transfusion medicine with international participation; 29 Sept - 01 Oct 2004; Ohrid, Macedonia. *Maked Med Pregl* 2004;58 (Suppl 63):22-4.
33. Obradović S, Rusović S, Balint B, Ristić-Andelković A, Romanović R, Baškot B, et al. Autologous bone marrow-derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction. *Vojnosanit Pregl* 2004;61(5):519-29.
34. Obradović S, Balint B, Rusović S, Ristić-Andelković A, Romanović R, Baškot B, et al. The first experience with autologous bone marrow derived progenitor cell transfer for myocardial regeneration after acute infarction. *Anest Reanim Transfuz* 2004;32(1-2):20.
35. Moog R. Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. *Transfus Apher Sci* 2004;31(3):207-20.
36. Ohto H. Efficient and safe stem cell apheresis. *Transfus Apher Sci* 2004;31(3):203-5.
37. Hofling AA, Sands MS, Lublin DM, Bauer G, Devine S. Collection of a mobilized peripheral blood apheresis product from a patient with mucopolysaccharidosis type VII and subsequent CD3⁺ cell isolation. *J Clin Apher* 2004;19(3):151-3.
38. Malchesky PS, Koo AP, Roberson GA, Hadsell AT, Rybicki LA. Apheresis technologies and clinical applications: the 2002 international apheresis registry. *Ther Apher Dial* 2004;8(2):124-43.
39. Strasser EF, Dittrich S, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Achenbach S, et al. Comparison of two mononuclear cell program settings on two apheresis devices intended to collect high yields of CD1⁺ and CD3⁺ cells. *Transfusion* 2004;44(7):1104-11.
40. Arat M, Arslan O, Ayyildiz E, Topcuoglu P, Dalva K, Ilhan O. Peripheral blood stem cell apheresis for allogeneic transplants: İbni Sina experience. *Transfus Apheresis Sci* 2004;30(3):189-91.
41. Nieto Y, Franklin WA, Jones RB, Berman SI, Pellom J, Baron AE, et al. Prognostic significance of occult tumor cells in the apheresis products of patients with advanced breast cancer receiving high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(6):415-25.
42. Siegenthaler MA, Vu DH, Ebnother M, Ketterer N, Luthi F, Schmid P, et al. 'Agglutination and flocculation' of stem cells collected by apheresis due to cryofibrinogen. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(7):765-7.
43. Verhopen F, Stalder M, Helg C, Chalandon Y. Resistant pure red cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation with major ABO mismatch treated by escalating dose donor leukocyte infusion. *Eur J Haematol* 2004;73(6):441-6.
44. Belford A, Myles O, Magill A, Wang J, Myhand RC, Wasilenko JK. Thrombotic microangiopathy (TMA) and stroke due to human herpesvirus-6 (HHV-6) reactivation in an adult receiving high-dose melphalan with autologous peripheral stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2004;76(2):156-62.
45. Balint B, Vucetic V, Trajkovic-Lakic Z, Petakov M, Bugarski M, Brajkovic G, et al. Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation efficacy. *Haematologia* 2002;32(4):363-76.
46. Balint B, Vucetic D, Vojvodic D, Brajkovic G, Ivanovic Z, Trkuljic M, et al. Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIb α /CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation. *Blood Banking Transf Med* 2004;2(1):22-6.
47. Balint B. Krvne ćelije i njihovi prekurzori - hemobiološki pristup i primena u komponentnoj terapiji. *Anest Reanim Transfuz* 2004;32(1-2).
48. Balint B. Renewed granulocyte support practice and its alternatives. *Vojnosanit Pregl* 2004;61:537-45.
49. Balint B. Matične ćelije hematopoeze: biologija i transplantacija. In: Balint B, Trkuljić M, eds. *Osnovi transfuziologije*. Beograd: Čigota; 2003. p. 349-78.
50. Balint B, Bugarski D, Petakov M, Stamatovic D. Quality control in haematopoietic stem cell collection and cryopreservation. In: Walterova L, Kretschmer V, Bogdanovic G, Rossi U, editors. *The contribution of clinical medicine to blood safety. Proceedings of the European School of Transfusion medicine: residential course; Belgrade (Serbia), 8-12 October 2003. Milano: ESTM; 2003. p. 91-8.*
51. Balint B. Coexistent cryopreservation strategies: microprocessor-restricted vs. uncontrolled-rate freezing of the "blood-derived" progenitors/cells. *Blood Banking Transf Med* 2004;2(2):62-71.
52. Douay L. Hematopoietic stem cells controls for autologous bone marrow transplantation monitoring. *Blood Transf Immunohaematol* 1985;28:397-409.
53. Rowley SD. Secondary processing, cryopreservation, and reinfusion of the collected product. In: Kessinger A, McMannis JD, editors. *Practical considerations of apheresis in peripheral blood stem cell transplantation*. Lakewood: Cobe BCT Inc; 1994. p. 53-62.
54. Rowley SD. Standards for hematopoietic progenitor cell processing. In: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA, Issitt LA, editors. *Hematopoietic progenitor cells: processing, standards and practice*. Bethesda: American Association of Blood Banks; 1995. p. 183-99.
55. Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:121-5.
56. Makino S, Harada M, Akashik K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, et al. A simplified method for cryopreservation of PBSC at -80°C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplant* 1991;8:239-44.

Summary

Introduction

Hematopoiesis is a continuous, dynamic and highly complex process resulting in production of various mature blood cells from a small population of pluripotent stem and progenitor cells through diverse proliferative and differentiative events. Numerous studies have demonstrated that a complex network of interactive cytokines regulates the survival, maturation, and proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs).

Application of cell-mediated therapy

Massive application of different cell-mediated therapeutic methods has resulted in an increased need for both specific HSPCs and operating procedures providing minimal cell damage during collection, processing and storage in a liquid or frozen state. Therefore, the basic aim of cell harvesting, selection, as well as cryopreservation is to minimize cell damage during these procedures. HSPCs are cells which exhibit

extensive self-renewal and proliferative capacity, associated with the capacity to differentiate into all blood cells and other cell lineages (plasticity of HSPC). Thanks to these properties, stem cells can provide complete and permanent restoration of hematopoiesis, which is the basis for clinical employment of HSPC transplantation. In addition, totipotent stem cells can be used for the so called "cell-therapy" in different clinical settings (e.g. myocardial regeneration after acute infarction).

Conclusion

Despite the fact that HSPC transplantation is already in routine use, some questions related to the optimal blood progenitor/cell collection, selection, storage and clinical use are still unresolved. Therefore, this review only briefly discusses the therapeutic use of HSPCs in different clinical areas and focuses on the recommendations, as well as the specific transfusion policies related to HSPC collection, processing, and cryopreservation with an emphasis on quality control.

Key words: Hematopoietic Stem Cells; Hematopoiesis; Cryopreservation; Biological Therapy; Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Rad je primljen 10. V 2006.

Prihvaćen za štampu 24. V 2006.

BIBLID.0025-8105:(2007):LX:1-2:42-47.