

KLİNİK ARAŞTIRMALAR

KORD KANI ALIM TEKNİKLERİ VE
SONUÇLARI

UMBILICAL CORD BLOOD COLLECTION TECHNICIS

Savaş KANSOY
Berna ATABAY
Ahmet KESKİNOĞLU
Serap AKSOYLAR
Haldun ÖNİZ
Güzide AKSU
Suat ÇAĞLAYAN

SUMMARY

Bone Marrow Transplation (BMT) is limited by the paucity of HLA matched donors and the frequent occurrence of GVHD (Graft Versos Host Disense). The use of umbilical cord blood (UCB) may alleviate some of the problems associated with BMT. Human UCB is an excellent source of hematopoietic stem cells for research and BMT.

We developed a simple and less invasive technique using branules,by which sufficien progenitor cell collection has also been provided. During the study we used four different methodes for UCB collection; "syringe only", "syringe+flush", "cut+drain" and "flush+cut+drain". UCB samples were obtained from normal fullterm vaginal deliveries. Collections were made, while the placenta was still in utero. Of total 82 cases studied, "syringe only", group included 52 cases, while other 30 patients were distributed equally in other three groups.

Cord blood harvests had volumes; of 94.1 ± 24 ml (50-160), Hb; of 15.5 ± 2.25 g, Htc; of 46.5 ± 7.2 , total MNC counts; of $70.4 \pm 32.1 \times 10^7$ (29.5-203.0), mean NC counts; of $16.1 \pm 6.8 \times 10^9$ /lt (6.2-46.0), CD34(+) cell ratio; of 0.8 ± 0.4 (0.13-1.75), total CD34(+) cell counts; of $54.9 \pm 34 \times 10^5$ (5.0-147.8).

Comparison of all of the groups has shown, that there were no statistically significant difference in respect of Hb, Htc, total WBC and MNC values, the ratio and the number of CD34(+) cells (K. Wallis and M. Whitney-U tests)

(Key Words: Bone Marrow Transplantation, Neonatal Transfusion, Fetal blood)

Çocuk Klinikleri (Doç.Dr.S Kansoy, Kli.Şefi, Uz.Dr.H Öniz,
Uz.Dr.B Atabay, Uz.Dr.G Aksu)
SSK Tepecik Eğitim Hastanesi 35120 İZMİR
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD (Prof.Dr.S Çağlayan)
Doku Tipi Laboratuvarı (Yrd.Doç.Dr.A Keskinoğlu)
Ege Tıp Fakültesi 35100 İZMİR

Yazışma: Doç.Dr.S Kansoy
Ege Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hastl. ABD 35100 İZMİR

ÖZET

Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) uygulamaları, doku gurupları tam uygun verici bulma zorluğu ve sık "Graft Versus Host Hastalığı (GVHD) " gelişmesi nedeni ile sınırlı kalabilmektedir. Umbilikal kord UKK) kanı kullanımı, KİT ile gelen birçok problemi ortadan kaldırmakta, araştırma çalışmaları ve KİT için mükemmel bir hematopoietik kök hücre kaynağı olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada umbilikal kord kanı toplanması için, branül kullanılarak basit ve daha az invazif bir teknik geliştirildi. Çalışma esnasında UKK toplanması için "Şırınga", Şırınga+Flaş", "Kesi+Drenaj", Kesi+Flaş+Drenaj" olarak dört farklı yöntem kullanıldı. UKK ürünleri, miadında ve 'vaginal doğum yapan kadınlarda, plasenta in utero iken elde edildi.

Toplam 82 hastanın 52'si şırınga gurubunda yer alırken, kalan 30 hasta diğer üç guruba eşit olarak dağılmakta idi. Kord kanı ürünlerinde volüm 94.1 ± 24 ml (50-160), Hb; of 15.5 ± 2.25 g, Htc; of 46.5 ± 7.2 , total mononukleer hücre MNC sayısı $70.4 \pm 32.1 \times 10^7$ (29.5-203.0), ortalama beyaz kan hücresi (BKH) sayısı $16.1 \pm 6.8 \times 10^9$ /lt (6.2-46.0), CD34(+) hücre oranı 0.8 ± 0.4 (0.13-1.75), toplam CD34(+) hücre sayısı $54.9 \pm 34 \times 10^5$ (5.0-147.8) olarak bulundu.

Tüm ürün toplama teknikleri karşılaştırıldığında; Hb, Ht, total BKH ve MNH değerleri, CD34(+) hücre oranları ve sayıları açısından dört gurup arasında istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (K.Wallis ve M.Whitney-U testleri).

(Anahtar Sözcükler: Fetal Kan, Kemik İliği Transplantasyonu, Yenidoğan kan nakli)

Kemik İliği Transplantasyonu (KİT), HLA-uygun verici sayısının azlığı ve sok GVHD riski nedeniyle ile kısıtlı yapılabilmektedir. Çeşitli nedenlerle kardeşlerin bile ancak %25'inin uygun verici olabileme şansı vardır. Umbilikal Kord Kanı (UKK), kök hücre kaynakları içerisinde, kemik iliği ve periferik kan kök hücresi ile birlikte önemli bir yer tutmaktadır. KK kullanımı, KİT ile birlikte görülen GVHD yamanma (engraftment) yetersizliği, geç hematolojik düzelmeye gibi bazı problemleri de azaltabilmektedir. İnsan kord kanı transplantasyon ve araştırmalar için değerli bir hematopoietik kök hücre kaynağıdır (1-4).

Bu araştırmada, UKK'ında daha büyük hacim ve daha yüksek sayıda kök hücre elde etmek amacıyla, bilinen bazı yöntemler kullanıldı ve değiştirildi.

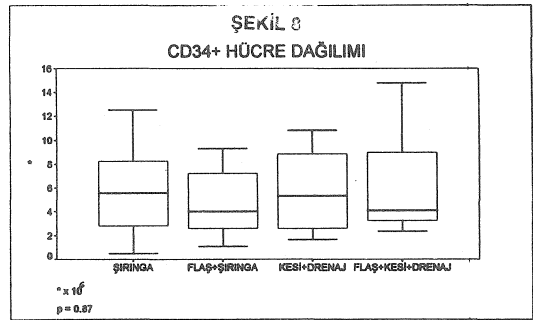
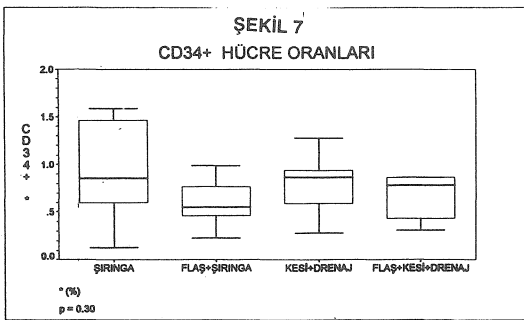
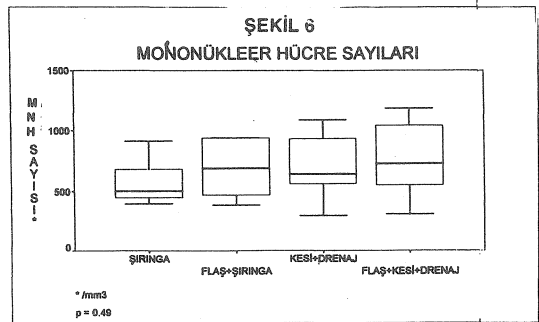
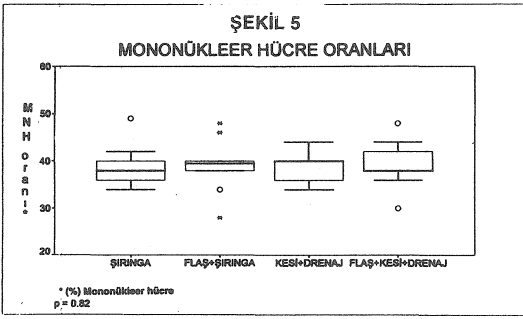
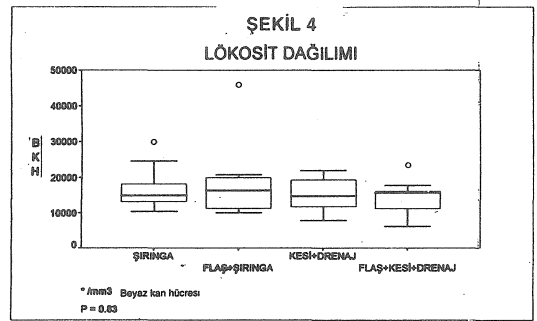
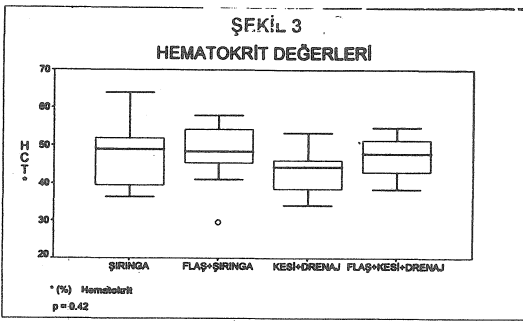
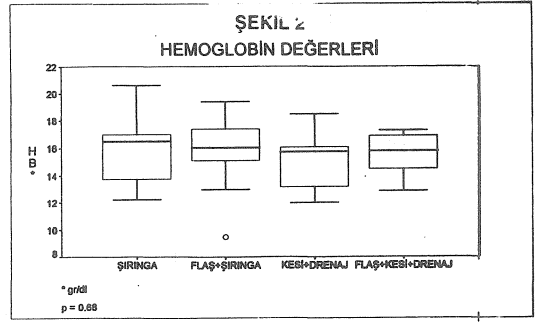
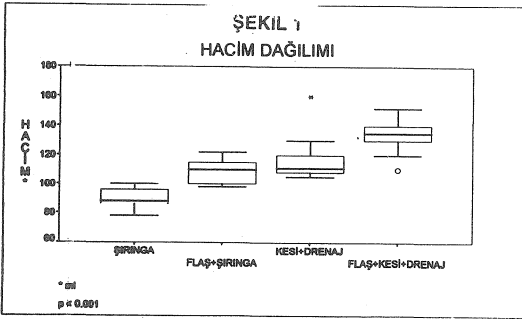
Bu sayede hem alım tekniğinin geliştirilmesine, hem de elde edilen ürünler arasında bir farklılık olup olmadığı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Şubat-Kasım 1995 tarihleri

arasında SSK Ege Kadın Doğum Hastanesinde yapıldı. Çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliği için, yaşları 20-40 arasında olan, sadece vajinal yolla matür doğum yapan ve komplikasyonsuz anneler rastgele seçildi. Konjenital malformasyonlar ile fetus ve annelerde irsi veya kan yoluyla geçen hastalığı olanlar işlem dışı tutuldu.

UKK ürünleri, "Şırınga", "Şırınga+Flaş" "kesi+Drenaj" ve "Kesi+Flaş+Drenaj" teknikleri kullanılarak, plasenta in utero iken elde edildi (5,6). Toplam 82 örneğin 52'si şırınga grubunu oluştururken, diğer 3 grupta 10'ar ürün toplandı. Doğum sonrasında bebeğin ortamdan uzaklaştırılmasını takiben, perine ve umbilikal kardon'da povidon iyodin ve alkole antisepsi sağlandı. Umbilikal ven çift yerden klempe edildi. Şırıngalı yöntemlerde kullanılmış olan ven kateteri, beslenme sondası veya metal iğneden farklı olarak, umbilikal vene 19.no branül ile girişimler yapılarak, sitrat fosfat dekstrozu plasenta kanı vakum yapılmadan yavaş olarak, üçlü musluk ile oluşturulan kapalı bir sistemde alındı ve boş kan torbalarına aktarıldı.



Toplanan ürünler, volüm, Hb, Ht, total çekirdekli hücre, beyaz kan hücresi (BKH), mononükleer hücre oranı ve sayısı, CD34(+) hücre oranı ve sayısı, pıhtı oluşumu ve bakteri bulaşması açısından değerlendirildi.

+4 C'de saklanan ürünlerden 1 ve 7. günlerde örnek alınarak, standart BBL-Septicheck kültür ortamına ekildi.

Tüm parametrelerde elde edilen sayısal değerler, kişisel bilgisayar (PC)'da SPSS istatistik programı kullanılarak "Kruskal Wallis" ve Mann Whitney-U" testleri ile incelendi.

SONUÇ ve BULGULAR

Dört ayrı teknikte elde edilen ürünlerin hacim, Hb Ht, ortalama beyaz kan hücresi (BKH) sayısı, Nononükleer Hücre (MNH) oranı ve her bir üründeki toplam ortalama sayıları, CD34(+) hücre oranı ve her bir üründeki toplam ortalama sayıları değerleri ve dağılımları Tablo 1'de görülmektedir.

TABLO 1: Umbilikal kord kanı toplam ürün değerleri (62 olgu)

	Ortalama	Ortanca	Dağılım
Hacim (ml)	94.1±24.0	88.0	50-160
Hb (%g)	15.5±2.25	15.8	9.5-20.6
Ht (%)	46.5±7.2	46.1	29.6-64.0
BKH sayısı (x10 ⁹ /lt)	16.1±6.7	15.4	6.2-46.0
MNH (%)	39.0±4.36	39.0	28.0-49.0
MNH sayısı	70.4±32.0	61.5	29.5-202.4
Ürün'de x10 ⁷			
CD34 (+)	0.8±0.4	0.77	0.13-1.75
CD34 (+) sayı	54.9±34.4	45.4	5.0-147.8

BKH: Beyaz kan hücresi

MNH: Mononükleer hücre

Tüm kordon kanı ürünleri birlikte ele alındığında volüm 94.1±24 ml (50-160), Hb; of %15.5±2.25 g, Htc; of %46.5±7.2, total MNH sayısı 70.4±32.1x10⁷(29.5-203.0), or-

talama BKH sayısı 16.1±6.8x10⁹/lt (6.2-46.0), CD34(+) hücre oranı %0.8±0.4(0.13-1.75), toplam CD34(+) hücre sayısı 54.9±34x10⁵ (5.0-147.8) olarak saptandı.

Gruplar arasında, "şırınga" grubu ile diğer üç grup arasında ve "şırınga+flaş", "kesi+drenaj" ile "Flaş+kesi+drenaj" grubunda sadece hacim bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü (p<0.001). Diğer tüm parametrelerde, Hb ve Ht değerleri, BKH sayısı, MNH oranı ve sayıları, CD34(+) hücre oranı ve sayıları açısından hiçbir anlamlı istatistiksel fark bulunmadı (Kruskal Wallis ve M. Whitney U testleri).

Elde edilen ürün değerinde kız ve erkek cinsleri arasında farklılık görülmedi.

Ürünlerde %5 oranında Stafilokokus epidermidis ile bulaşma %3'ünde gözle görünen pıhtı saptandı.

Doğum ağırlığı ile plasenta kan hacmi karşılaştırıldığında, gebelik haftası gruplarına göre anlamlı fark olduğu görüldü (p<0.01). Plasentadan alınan kan hacmini etkileyen yaş, gestasyon yaşı, cins gibi faktörler incelendiğinde "stepwise multiple (adım adım çoklu) regresyon analizi" sonucunda yalnız doğum ağırlığı ile ilişkili olduğu saptandı ve formüle edildi.

Sonuç olarak,

1. UKK allotransplantasyon için değerli bir kaynaktır. Elde edilen ortalama CD34(+) hücre sayıları, erişkin bir insan için dahi yeterli kök hücre miktarını sağlayabilmektedir.

2. UKK ürünü, kolay ve noninvaziv bir yöntemle elde edilebilmektedir.

3. Doğumhane şartlarında dahi güvenilir olarak elde edilebilen bir materyaldir.

4. Alınacak ortalama ürün miktarı; Hacim = 31.29 + [0.014xDoğum Ağırlığı (gr)] formülü ile önceden tahmin edilebilir.

Çalışmada, kontaminasyon güvenliği ve ürün kalitesi açısından UKK toplama yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ayrıca daha az invazif olması ve daha kolay uygulama olanağı sağlaması

nedeni ile, branül ile uygulanan şırınga'lı yöntemlerin daha pratik olduğu görülmektedir.

TARTIŞMA

Tedavide kür elde etme amacıyla uygulanan küratif tedaviler veya vücutta hastalıklı kan hücrelerini sağlıklı olanla değiştirme konusunda yüzyılın başından beri harcanan çabalar sonucunda, günümüzden 40 yıl kadar önce, bugünkü düşünceye uygun kemik iliği trasplantasyonları başlamıştır. Otolog ve allojenik türde yapılan bu kemik iliği nakilleri, son 9 yılda otolog türde %85'lere kadar varan oranda, allojenik türde ise kısmen periferik kan kök hücre nakline dönüşmüştür. Kardeş vericiden yapılması istenen allojenik kök hücre ve KİT uygulamaları, HLA doku grupları uygun verici bulma zorluğu ve sık Graft versus Host Hastalığı" gelişmesi nedeni ile sınırlı kalmaktadır.

Günümüzde yapılan çalışmalar, plasenta kanının da kemik iliği kadar kök hücre içerdiği ve bunların yüksek kendini yenileme yeteneğine sahip olduğunu, ayrıca HLA doku guruplarının tam gelişmemiş olması nedeni ile "Kök Hücre Nakli" ve çeşitli çalışmalar için mükemmel bir hematopoetik kök hücre kaynağı olduğunu göstermiştir. UKK'nın trasplantasyonda kullanımı, KİT ile gelen birçok problemi de ortadan kaldırebilmektedir.

Çalışmamızda, şırıngalı yöntemlerde önceleri kullanılmakta olan ve kateteri beslenme sondası veya metal iğneden farklı olarak branül ile umbilikal vene girişimler yapıldı. Bu yöntemin daha az invazif ve daha kolay girişim imkanı sağladığı görüldü (6). Ayrıca, teknik yöntemler arasında, elde edilen hücre sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamış olması, ürünün kirlenme güvenliği açısından bakıldığında, en kapalı sistem olma özelliği gösteren "Şırınga" sistemini ön plana çıkırmaktadır.

Ayrıca "Flaş"lı yöntemlerde daha fazla hacimde ürün elde edilmesi, ürün saflaştırma

ve yoğunlaştırma koşullarının uygun olmadığı yerlerde bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir. Bunlar arasında, daha yüksek hacim ve eritrosit miktarı, ürünün dondurulmasında kullanılan Dimetilsulfoksit (DMSO) gibi toksit maddelere ihtiyacın artması, maliyetlerin yükselmesi ve depolamada daha fazla yer gerekmesi gibi faktörler önemli olmaktadır.

UKK ile yapılan trasplantasyonlarda, en az 1×10^7 /kgMNH sağlanması gerekmektedir. Topladığımız ürünlerde, normal kilodaki erişkinler için dahi yeterli MNH değerleri elde edilmiştir.

Ürünlerde Staf. Epidermidis ile kontaminasyon %5, makroskopik pıhtı ise %3 oranında saptandı. Çeşitli serilerde de %2.8-12 arasında kontaminasyon riski bildirilmektedir. Kontaminasyonlar, umbilikal kordonun temizlenmesi, plasenta kanının alınması ve depolanması sırasında olmaktadır (2,3).

Kord kanı ile kök hücre ürünü elde etmede, daha az iğne aspirasyonları ve küçük plasenta manipulasyonları, ürünlerdeki bakteriyel ve fungal bulaşmaları azaltmak için önemli bir faktör olmaktadır (6).

Ürün toplamada 10-20 dakika gibi sürelerde hızlı hareket etmek önemli olmaktadır, çünkü geri dönüşümsüz pıhtı formasyonu gelişmektedir.

Literatürde sezeryan doğumlarda, azalmış uterus içi basıncına bağlı daha çok miktarlarda ürün toplanabildiği bildirilmektedir.

Plasenta kanının güvenilirliğine ilişkin diğer önemli bir nokta ise, kanın anne kanı ile karışarak, greftin konağa karşı reaksiyonuna yol açmasıdır. Bu tehlikenin pek olası görülmemesi yanında maternal kanın kirlenme oranını saptamak, günlük pratikte mevcut tekniklerle pek olası değildir.

UKK ile yapılacak trasplantasyon ve transfüzyonlar için, güvenilir ve yeterli ürünler elde edildiği görülmüş olmakla beraber, bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Anderson S, fragman S, Wagner G, Uden D. Retrieval of plasental blood from the umbilical vein of to determine volume, sterility and presence of clot formation. *AJDC*. 1992 ; 146 : 36-8.
2. Golden SM, Petit N, Mapes T, Davis S, Monaghan WP. Bacteriologic assesment of autologous cord blood for neonatal transfusion. *Am J Obstet Gynecol*. 1984 ; 149 : 907-8.
3. Golden SM, O'Brien WF, Lissner C. Hematologic and bacteriologic assesment of autologous cord blood for neonatal transfusions. *J Pediatr*. 1980 ; 97 : 810-2.
4. Paxon CL Jr. Collection and use of autologous fetal blood. *Am J Obstet Gynecol*. 1979 ; 134 : 708-10.
5. Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 1994 ; 13 : 135-43.
6. Turner CW, Luzins J, Hutcheson C. A modified harvest techique for cord blood hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplantation*. 1992 ; 10 : 89-91.