

Krew pępowinowa. Część druga – terażniejszość

***Dariusz Boruczkowski¹, Katarzyna Pawelec², Anna Pieczonka³, Piotr Michalski⁴**

¹NZOZ – Polski Bank Komórek Macierzystych w Warszawie
Kierownik: dr n. biol. Tomasz Ołdak

²Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. Michał Matysiak

³Polski Bank Komórek Macierzystych S.A. w Warszawie
Prezes Zarządu: Jakub Baran

⁴Szpital Ginekologiczno-Położniczy Ujastek w Krakowie
Dyrektor Szpitala: dr Jan Kosacz

CORD BLOOD. PART TWO – THE PRESENT

Summary

The first report about haematopoietic stem cells transplantation from cord blood with good result, was published in 1989. Since then, the major changes have occurred, based on scientific and technical developments and umbilical cord blood (CB) banks have been established in six continents. Since the first CB transplantation, more than 21 000 transplantations have been reported worldwide and more than 1 000 000 cord blood units (CBUs) have been stored in more than 100 CB banks. Results and the courses of CBUs transplantations in malignant and nonmalignant diseases, in adults and children, show, in comparison with others stem cells sources (bone marrow and mobilized peripheral blood), that CB has several advantages, including prompt availability of the transplant, decrease of Graft versus Host Disease and better long-term immune recovery resulting in a long-term survival. Today developments still want improve on engraftment, by i.e. ex vivo expansion of stem cells, intrabone injection of CB cells and double/simultaneous CB transplantations. In addition to hematopoietic stem cells, cord blood and especially placenta contain a large number of nonhematopoietic (mesenchymal) stem cells. Today, after over twenty years standards use of hematopoietic stem cells and shorter use of mesenchymal stem cells, the articles describing medical application of both kinds of cells, confirm the possibility of more and more diseases treatment and in the absence of ethical concern, the unlimited supply of mesenchymal cells explains the increasing interest of using cord blood for developing regenerative medicine.

Key words: cord blood, stem cells, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells

NASTĘPNE PRZESZCZEPIENIA KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z PBKM S.A.

Od przestania do redakcji pierwszej części artykułu (1) w listopadzie 2010 roku, przez następne cztery miesiące, do marca 2011 roku PBKM S.A. i jeden z współtworzących podlegającą PBKM, europejską grupę banków krwi pępowinowej (FamiCord) Krio – Instytut (Węgry), przekazały do leczenia dzieci następne dwie porcje allogenicznych preparatów krwi pępowinowej (KP). Piąta transplantacja KP została przeprowadzona w Misz-

kolcu. Była to pierwsza na Węgrzech transplantacja allogenicznej KP. Transplantacja KP od młodszej siostry w tym przypadku dotyczyła dziewczynki z ostrą białaczką limfoblastyczną, u której ze względu na powtarzające się od momentu rozpoznania zakażenia, nie można było prowadzić należącego leczenia. Szósta transplantacja odbyła się 7 stycznia 2011 roku w Katedrze i Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Biorczynią była dziewczynka leczona z powodu niedokrwistości Fanconiego. W dniu transplantacji lekarze uzupełnili brakującą ilość komórek,

pobierając szpik od zgodnego młodszego brata, od którego została wcześniej pobrana KP. Obydwie pacjentki zostały po transplantacji w stanie klinicznym dobrym zwolnione do domu. Aktualnie (marzec 2011) PBKM przygotowuje się do przekazania następnych jednostek krwi pępowinowej do przewidywanych dwóch transplantacji krwi pępowinowej.

PRZYKŁADY ZWIĘKSZANIA LICZBY KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ

Najprawdopodobniej pierwsze próby leczniczego przetaczania oraz przechowywania KP zostały opisane w 1939 roku (2, 3). Kilka lat później próbowano zastosować KP w leczeniu braku miesiączki (4). Jednak pierwszą udaną transplantację KP przeprowadzono dopiero w 1988 roku (5), a już od początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku (6) zaczęto zdawać sobie sprawę z ograniczeń ilościowych tego źródła krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM). Badania laboratoryjne (7, 8) trwały do roku 1999, kiedy to najprawdopodobniej po raz pierwszy (9) odbyło się równoczesne (w tym samym dniu) przeszczepienie namnożonych odpowiednio wcześniej przed transplantacją i nienamnożonych KKM z KP. Dodatkowo, opisana metoda została przeprowadzona po raz pierwszy, w przeciwieństwie do wcześniej stosowanej metody polegającej na przetoczeniu w dniu transplantacji części komórek, a po 10-12 dniach po pierwszym przetoczeniu, namnożonych KKM w warunkach laboratoryjnych. Już w roku 2000 przeprowadzono prawdopodobnie pierwsze przeszczepienie KKM z KP wyłącznie namnożonych przez 12 dni poprzedzających transplantację, przy użyciu urządzenia o nazwie Aastrom Replicell System (10). Namnożone odpowiednio wcześniej komórki przetoczono dwojgu pacjentom z przewlekłą białaczką szpikową, dla których nie znaleziono dawcy rodzinnego lub niespokrewnionego. Korzystając z możliwości namnażania komórek macierzystych, w roku 2003 opisano grupę 27 pacjentów (11) z chorobami nowotworowymi i nienowotworowymi, którym przetaczano komórki w dwóch porcjach. W dniu „0” – komórki, które nie podlegały żadnej manipulacji oraz w dniu +12 komórki namnażane od dnia transplantacji w warunkach laboratoryjnych. Rok później opisano komórki (CD45-) ludzkiej krwi pępowinowej, które namnażane poza organizmem (ekspansja do ilości 10^{15}) różnicowały się w komórki tkanki nerwowej (mózgu), kości, chrząstki, wątroby i mięśnia sercowego (12). Innym przykładem dotyczącym pośredniego uzupełnienia liczby KKM są m.in. włosko-szwedzkie badania (13) dotyczące namnażania przed transplantacją KP dodatkowych komórek pochodzących ze szpiku rodziców. Być może następną możliwością skrócenia okresu odnowy układu krwiotwórczego po transplantacji będzie podawanie KP nie dożylnie, tylko bezpośrednio do kości talerza biodrowego (14). Według autorów bezpośrednie podawanie KP do kości powoduje 100% przyjęcie przeszczepionego materiału, szybsze dojrzewanie i różnicowanie się przeszczepionych komórek, krótszy

czas odnowy układu krwiotwórczego oraz zredukowaną ilość przypadków GvHD. Poza tym, również w Polsce, w przypadku ciężkiego pacjenta można przeszczepiać jednocześnie dwie jednostki KP (15).

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste

Badania szpiku i krwi pępowinowej (12) wykazywały, a obecnie również potwierdzają, że inne komórki (16) różniące się od KKM mogą różnicować się w kolejne tkanki (17-19). Przy zastosowaniu metody cytometrii przepływowej scharakteryzowano je jako populację komórek tkankowych (mezenchymalnych) posiadających następujące antygeny: CD73, CD105, CD166, CD90 i CD29 natomiast w odróżnieniu od komórek układu krwiotwórczego nie posiadają takich antygenów jak: CD34, CD45 czy CD14 (20-22). W badaniach doświadczalnych wykazano między innymi, że mezenchymalne komórki macierzyste (MKM) wspomagają wszczepienie, namnażanie i różnicowanie przeszczepionych KKM. Ponadto komórki te nie indukują odpowiedzi immunologicznej, a nawet wykazują działanie immunosupresyjne. W badaniach *in vitro* dowiedziono, że MKM wpływają na limfocyty T, komórki prezentujące antygen, komórki NK, a także limfocyty B (23-25).

Dokładny mechanizm działania immunosupresyjnego nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony, prawdopodobnie ma on złożony charakter i jest spowodowany wydzielaniem cytokin przeciwzapalnych powodujących hamowanie proliferacji limfocytów T, indukcją komórek regulatorowych, procesami naprawczymi w obrębie uszkodzonych tkanek (26-28).

Obecnie, dla celów klinicznych poszukuje się nowych źródeł MKM. Kryteria ustalone przez ISCT (International Society for Cellular Therapy), jakie musi spełniać populacja komórek, żeby można ją było uznać za populację macierzystych komórek mezenchymalnych to: ekspresja charakterystycznych antygenów, samopowielanie, różnicowanie w tkanki kostną, chrzęstną, mięśniową czy nerwową, funkcje ułatwiające wszczepienie przeszczepionych komórek hematopoetycznych oraz działanie immunomodulujące. Kryteria te spełniają nie tylko MKM pochodzące ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej, ale również komórki pozyskane z galarety Whartona (29). Macierzyste komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona wykazują znacznie większy potencjał proliferacyjny niż komórki pochodzące ze szpiku (30). Mimo wielokrotnego ich pasażowania nie stwierdzono zmian w kariotypie (31, 32). Prassana i wsp. w swojej pracy porównywali (33) mechanizm immunomodulacyjny MSC pochodzących ze szpiku kostnego oraz z galarety Whartona. Wykazano, że komórki pochodzące z obu tych źródeł zmniejszają produkcję cytokin prozapalnych INF- α i TNF- α .

Dwudziesty pierwszy wiek przynosi coraz więcej opisów stosowania komórek macierzystych w nowych dziedzinach medycyny. W 2005 r. naukowcy angielscy, kontynuując badania nad możliwościami odnowy wątroby opisali (34-36) pierwszą na świecie laboratoryjną hodowlę komórek pochodzących z KP charakteryzującą się eks-

presją markerów błony komórkowej charakterystycznych dla hepatocyta oraz posiadających zdolność produkcji albumin (37). Amerykanie zróżnicowali komórki z KP w części nabłonka dróg oddechowych – pneumocyty typu II – występujące na poziomie pęcherzyków płucnych. Produkcję białka C – charakterystyczną dla pneumocytów – potwierdzono badaniami immunofluorescencyjnymi i badaniem metodą Real Time PCR (38). Międzynarodowy (amerykańsko-francusko-brytyjski) zespół odkrył metodę pozyskiwania *de novo* insuliny. Jest to pierwsze doniesienie o możliwości laboratoryjnego wytworzenia insuliny przy pomocy ludzkiej KP (39). Poza próbami laboratoryjnymi również leczy się cukrzycę typu 1 również klinicznie – przeszczepiając u *de novo* rozpoznanych pacjentów autologiczne KM (40), podkreślając pozytywne znaczenie zawartych w KP limfocytów regulatorowych CD4+CD25+ (regulatory *T cells* –Treg) (41). W Polsce również przeszczepia się autologiczne komórki celem wyleczenia z cukrzycy (42). Podstawą były między innymi coraz szersze badania potwierdzające jej zdolność do produkcji tkanki nabłonkowej, przydatnej w leczeniu ran skóry (43, 44), chorób rogówki (45), chorób przewodu pokarmowego (46) i chorób płuc (47). Powyższe, nowe możliwości komórek macierzystych potwierdzają dane Europejskiej Grupy Transplantacji Krwi i Szpiku (EBMT) (48). W 2008 roku przeprowadzono tylko w krajach zrzeszonych w EBMT 313 transplantacji KKM w leczeniu chorób związanych z układem krążenia. W leczeniu chorób neurologicznych przeprowadzono 74 transplantacje a w medycynie regeneracyjnej 67 procedur ich podania. Komórki mezenchymalne również tylko na obszarze EBMT, również tylko w 2008 roku użyto w 357 przypadkach. Łącznie komórki macierzyste zostały użyte w leczeniu nowych jednostek chorobowych podczas 811 procedur, a co najważniejsze (oprócz nowych wskazań do ich użycia), w tej liczbie w 530 przypadkach były to komórki własne (48). Z powyższych danych wynika, że na świecie i w Europie systematycznie wprowadza się metodę leczenia własnymi komórkami macierzystymi w nowych gałęziach medycyny, stale szukając możliwości zastosowania transplantacji komórek macierzystych w leczeniu coraz szerszej liczby chorób. Nawet do tej pory w ten sposób zupełnie nieleczonych. To dobrze rokuje na przyszłość.

Piśmiennictwo

1. Boruckowski D, Pawelec K, Michalski P: Krew pępowinowa. Część pierwsza – przeszłość. *Nowa Pediatria* 2010; 4: 121-123. 2. J. Halbrecht: Transfusion with placental blood. *Lancet* 1939; 233: 202-203. 3. J. Halbrecht: Fresh and stored placental blood. *Lancet* 1939; 234: 1263-1265. 4. J. Halbrecht: Placental blood in the treatment of amenorrhoea. *Lancet* 1941; 238: 630. 5. Gluckman E et al.: Haematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anaemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N Eng J Med* 1989; 321: 1174-1178. 6. Broxmeyer HE et al.: Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4109-4113. 7. Koller MR et al.: Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 653-663. 8. Capmany G et al.: Short-

term, serum-free, static culture of cord blood – derived CD34+ cells: Effects of FLT3-L and MIP-1 alpha on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1999; 84: 675-682. 9. Kögler G et al.: Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 397-403. 10. Pecora A et al.: Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 797-799. 11. Jaroscał J et al.: Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo – expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003; 101: 5061-5067. 12. Kögler G et al.: A new Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123-135. 13. Galski H et al.: A novel MDR-dependent pharmacological approach for ex-vivo expansion of haematopoietic stem cells from human cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 126-127. 14. Raiola AM et al.: Direct intra – bone marrow transplant of cord blood cells: a way to overcome delayed engraftment in adult patients. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: S31. 15. Jędrzejczak W et al.: Simultaneous transplantation of two allogeneic units of cord blood in an adult patient with acute myeloblastic leukemia. A case report. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53: 364-368. 16. Rogers I et al.: Identification and analysis of in vitro cultured CD45-positive cells capable of multi lineage differentiation. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1839-1852. 17. Koc O, Lazarus HM: Mesenchymal Stem Cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 235-239. 18. McGuckin CP et al.: Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 2004; 295: 350-359. 19. Kucia M, Halasa M, Wysoczyński M: Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human umbilical cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007; 21: 297-303. 20. Deans RJ, Moseley AM: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-884. 21. Barry F et al.: SH-3 and SH-4 antibodies recognized distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 519-524. 22. Barry FP et al.: The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 134-139. 23. Tse WT et al.: Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 389-397. 24. Krampera M et al.: Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T-cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729. 25. Maitra B et al.: Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597-604. 26. Meisel R et al.: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103: 4619-4621. 27. Aggarwal S, Pittenger MF: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-1822. 28. Le Blanc K, Ringden O: Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 321-334. 29. Klopp AH et al.: Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cell* 2011; 29: 11-19. 30. Mitchell KE et al.: Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21: 50-60. 31. Weiss ML et al.: Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24: 781-792. 32. Karahuseynoglu S et al.: Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007; 25: 319-331. 33. Prasanna SJ et al.: Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem

- cells differentially. *PLoS One* 2010; 5(2): 9016. **34.** Fausto N, Campbell JS: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117-130. **35.** Austin TW, Lagasse E: Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120: 131-135. **36.** Yoon B-I, Choi Y-K, Kim D-Y: Differentiation processes of oval cells into hepatocytes: proposals based on morphological and phenotypical traits in carcinogen – treated hamster liver. *J Comp Pathol* 2004; 131: 1-9. **37.** McGuckin CP et al.: Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005; 38: 245-255. **38.** Berger MJ et al.: Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 480-487. **39.** Denner L et al.: Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif* 2007; 40: 367-380. **40.** Hussain MA, Theise ND: Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet* 2004; 364: 203-205. **41.** Haller MJ et al.: Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 2008; 36: 710-715. **42.** Starski E et al.: Alleviation of exogenous insulin requirement in type 1 diabetes mellitus after immunoablation and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119: 422-426. **43.** Badiavas E et al.: Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003; 196: 245-250. **44.** Valbonesi M et al.: Cord blood stem cells for wound repair. Preliminary report of 2 cases. *Transfus Apher Sci* 2007; 30: 153-156. **45.** Germain L et al.: Reconstructed Human Cornea Produced in vitro by Tissue Engineering. *Pathobiology* 1999; 67: 140-147. **46.** Burt RK et al.: High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003; 101: 2064-2066. **47.** Machiarini P et al.: Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023-2030. **48.** Gratwohl A et al.: The EBMT activity survey 2008 impact of team size, team density and new trends. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 174-191.

nadesłano: 23.03.2011

zaakceptowano do druku: 06.05.2011

Adres do korespondencji:

*Dariusz Boruckowski

NZOZ – Polski Bank Komórek Macierzystych S.A.

ul. Grzybowska 2/41, 00-131 Warszawa

tel./fax: (22) 436-40-49

tel./fax: (22) 436-40-50

e-mail: dariusz.boruckowski@pbkm.pl