

# Presaditve matičnih celic iz popkovnične krvi – dve desetletji kliničnih izkušenj

Umbilical cord stem cell transplantation – two decades of clinical experience

Primož Rožman,<sup>1</sup> Janez Jazbec,<sup>2</sup> Dragoslav Domanović<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

## Korespondenca/ Correspondence:

izr. prof. dr. Primož Rožman, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana.  
Mail: primoz.rozman@ztn.si

## Ključne besede:

popkovnična kri, matične celice, krvotvorne matične celice, ekspanzija, transplantacija

## Key words:

umbilical cord blood, stem cells, haematopoietic stem cells, expansion, transplantation

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81: 413–21

Prispelo: 2. mar. 2011,  
Sprejeto: 5. jul. 2011

## Izvleček

V popkovnični krvi (PK) je obilo krvotvornih matičnih celic (KMC), ki jih lahko uporabimo za zdravljenje z alogensko presaditvijo. Od prve presaditve humanih KMC iz PK leta 1988 do danes je bilo zbranih že veliko znanstvenih podatkov. Po svetu je nastalo mnogo javnih bank PK, ki zbirajo in shranjujejo več kot 400.000 enot PK za mednarodno izmenjavo. Poleg tega je verjetno še enkrat več enot PK shranjenih v zasebnih bankah. Več kot 20.000 enot PK so že uporabili za zdravljenje malignih in nemalignih bolezni otrok in odraslih s presaditvijo. Nesorodne KMC iz PK so postale alternativni vir celicam iz kostnega mozga, ker imajo določene prednosti – predvsem takojšnjo razpoložljivost, povzročajo pa tudi manj bolezni presadka proti gostitelju (GVHD) ob podobnem dolgoročnem preživetju. Poleg tega lahko KMC iz PK presadimo odraslim kljub neskladju v antigenih HLA, kar je še posebej pomembno pri bolnikih, ki ne najdejo HLA-skladnega dajalca. Glavni vzrok za neuspehe pri presaditvah celic iz PK, še posebno pri odraslih, je majhno število KMC v enotah PK. Zato so razvili nove pristope, kot so presaditve dveh ali več enot PK, aplikacija celic neposredno v kostni mozeg, hkratna presaditev akcesornih celic in nemieloablativno kondicioniranje bolnika pred presaditvijo. V teku so tudi klinične študije z matičnimi celicami iz PK, ki jih prej namnožijo *in vitro*. Omenjeni postopki, v bolj oddaljeni prihodnosti pa tudi razvoj regenerativne medicine, bodo še razširili možne indikacije za uporabo PK tudi pri odraslih.

## Abstract

Umbilical cord blood (UCB) is an abundant source of haematopoietic stem cells (HSC) for allogeneic HSC transplant. Since the first UCB transplant in 1988, many scientific data have been collected. Many umbilical cord blood banks have been established worldwide for the collection and cryopreservation as well as for the international exchange with more than 400,000 UCB units available. There is probably a twofold figure of UCB units collected for the private UCB banks. More than 20,000 UCB units have been used for treating malignant and non-malignant diseases both in adults and children. Unrelated UCB HSCs became an alternative to bone-marrow derived HSCs based on their advantages, including a prompt availability, decrease of graft-versus-host disease (GVHD) and better long-term immune recovery, resulting in a similar long-term survival. UCB stem cells can be transplanted to an allogeneic patient in spite of the high degree of HLA mismatches, which is highly important for the patients who cannot find a HLA-identical allogeneic donor. Since the low number of cells in the UCB units still represents the main cause of failure of engraftment, new strategies, such as double-unit UCB transplantation, intra-bone injection of UCB cells, simultaneous transplantation of accessory cells and the reduced intensity conditioning regimen, were developed to increase the success of UCB transplantation. Several clinical studies using UCB stem cells that have been previously expanded *in vitro* are underway. These procedures and the future development of regenerative medicine will further broaden possible indications for the use of UCB derived stem cells in adults.

## Uvod - matične celice v popkovnični krvi

Matična celica (MC) je nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima tri ključne lastnosti: sposobnost dolgotrajnega deljenja in tvorbe sebi identičnih kopij (t.i. samo-obnavljanje), sposobnost razvoja v različno usmerjene potomke (t.i. diferenciacija) in sposobnost plastičnosti – po presaditvi v novo okolje pridobi MC vse lastnosti tega novega okolja, čeprav se to nahaja v drugem kličnem listu.<sup>1</sup> Obstaja več vrst matičnih celic odraslega, med katerimi so najbolj raziskane krvotvorne matične celice (KMC), ki jih lahko pridobimo iz kostnega mozga ali periferne krvi in uporabimo za zdravljenje. Oba načina zbiranja KMC sta neprijetna za darovalca in terjata ustrezen medicinski poseg, zato se širi uporaba KMC iz popkovnične krvi (PK). V zavrženem materialu posteljice in popkavnice po porodu namreč ostane od 50 do 150 mL PK, iz katere lahko osamimo KMC in jih uporabimo za avtologno ali alogensko zdravljenje s presaditvijo.<sup>2</sup>

Prvič je poročal o uporabi PK Ende s sodelavci v ZDA leta 1972.,<sup>3</sup> prvo učinkovito presaditev PK pa je opravila Gluckmanova v Parizu l. 1988, ki je otroku s Fanconijevo anemijo presadila KMC njegove HLA identične sestre<sup>4</sup> in ta bolnik še vedno živi in je zdrav.

V primerjavi s kostnim mozgom ali periferno krvjo ima PK več prednosti, a tudi določene pomanjkljivosti. Prednosti so predvsem v enostavnem zbiranju, ki matere ali novorojenca ne izpostavi nobenemu tveganemu postopku. Poleg tega so enote PK trajno zamrznjene in so na razpolago takoj, ko je potrebna presaditev.<sup>5</sup>

Pomembna prednost KMC iz PK je tudi v tem, da manjkrat izzovejo akutno in kronično bolezen presadka proti gostitelju (GvHD), pa čeprav so neskladne v transplantacijskih antigenih HLA. Visoka stopnja ujemanja v antigenih HLA, ki je ključna za prejemnike KMC iz kostnega mozga, je mnogo manj pomembna pri prejemnikih KMC iz PK, pri katerih je uspeh presaditve pri ujemanju 4/6 enak uspehu presaditve pri prejemnikih kostnega mozga z ujemanjem alelov 6/6 in celo 8/8.<sup>6</sup> Večja toleranca do tkivnega neskladja pri presaditvi KMC iz

PK v primerjavi s KMC iz kostnega mozga odraslega je verjetno posledica dejstva, da se v PK nahaja manj celic T, ki imajo poleg tega še večinoma naiven imunski repertoar.<sup>7</sup> Da presadek iz PK vseeno dobro deluje tudi proti levkemičnim celicam, so zaslužne naravne celice ubijalke (NK-celice) v PK.<sup>8</sup>

Glavna pomanjkljivost KMC iz PK je v okolščini, da povprečna shranjena enota PK (okrog 100–150 mL) vsebuje skoraj desetkrat manj KMC kot enota KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi. Zaradi tega po presaditvi KMC iz PK kasneje pride do vgnednje presadka, pogostejša pa je tudi njegova odpoved. Za povečanje števila KMC v enotah PK so razvili več strategij (glej dalje), s čimer se je uspeh presaditev PK pri odraslih povečal, tako da od leta 2005 naprej opravijo celo več presaditev PK pri odraslih kot pri otrocih.<sup>9</sup>

## Presaditve alogenske popkovnične krvi za zdravljenje malignih bolezni

Presaditve PK v večjem obsegu so začeli izvajati šele po l. 2000 in so se izkazale kot zelo uspešne. Od l. 1999 do 2009 je prejelo KMC iz PK že več kot 21.387 otrok in odraslih.<sup>10</sup> Za primerjavo so do marca 2010 skupno izvedli okrog 358.000 presaditev KMC iz vseh treh virov.<sup>11</sup> Leta 2008 so v Evropi uporabili PK za presaditev v 5,4 % primerov vseh alogenskih presaditev KMC.<sup>12</sup> Danes lahko za kar 95 % bolnikov, ki potrebujejo alogensko presaditev, najdemo skladno enoto PK v registrih PK. Za razliko od tega pa najdemo HLA-skladnega darovalca KMC samo za nekaj več od polovice bolnikov, ki jo potrebujejo, čeprav je v svetovnih registrih darovalcev že več kot 16 milijonov darovalcev.<sup>13</sup> Popkovnično kri za alogensko presaditev shranjujejo javne banke popkovnične krvi, ki jih ponavadi financira država in jih podpira tudi mnenje mednarodnih organizacij, npr. EBMT in ASBMT.<sup>5,10,11</sup>

Uspešnost presaditev KMC iz PK je praviloma odvisna od celičnega odmerka in tkivne skladnosti. V primerih sorazmerno velikega neskladja v antigenih HLA med PK in prejemniki so pri uporabi PK opazili pre-

senetljivo nizko pojavnost GvHD. Akutna GvHD je nastopila pri 11–39 %, kronična pa pri 9–31 % bolnikov po presaditvi PK, kar je precej manj v primerjavi s presaditvijo KMC iz kostnega mozga ali periferne krvi. Smrtnost zaradi samega postopka presaditve je bila relativno visoka (okrog 50 %), kar je bilo vsaj delno povezano z dejstvom, da je šlo za bolnike z visokim tveganjem in napredovalo boleznijo. Preživetje bolnikov, ki so prejeli skladden KM, in bolnikov, ki so prejeli nesorodno in neskladno PK, je podobno. Primerjalne raziskave so jasno pokazale, da je presaditev nesorodne PK veljavna alternativa presaditvi KMC iz KM ali periferne krvi ne samo za pediatrične, ampak tudi za odrasle bolnike.<sup>13</sup>

Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na prijetje presadka in posledično na preživetje bolnikov, je še vedno število oziroma odmerka presajenih matičnih celic.<sup>14</sup> Skupina EuroCord priporoča, da je v enoti PK, ki jo odvzamejo in shranijo, število celic z jedrom (angl. nucleated cells – NC) vsaj  $3 \times 10^7$ /kg telesne mase (TM) prejemnika, po odmrznjenju in pri presaditvi pa naj bi enota za presaditev vsebovala vsaj še  $2 \times 10^7$  NC/kg telesne mase.<sup>15</sup> Skladnost v antigenih HLA med dajalcem in prejemnikom je dodatni dejavnik, ki vpliva na izid presaditev PK.<sup>16</sup> Gluckmanova s sodelavci meni, da naj bi ujemanje v antigenih HLA razreda II (tj. HLA-DR) dalo najboljše rezultate. Navaja tudi, da povečanje celičnega odmerka vsaj ublaži negativen vpliv neskladnosti v HLA na uspeh presaditve.<sup>17</sup>

## Klinične posodobitve presaditve matičnih celic iz popkovnične krvi

Na podlagi začetnih ohrabrujočih rezultatov presaditve PK so se te zelo razširile in postale še bolj uspešne. Presaditev PK je uspešna tudi pri odraslih. Takahashi s sod. je leta 2007 objavil prvo večjo študijo o presaditvah nesorodne PK pri 100 bolnikih s krvnimi malignomi, za katere niso našli ustreznega skladnega darovalca. Izide so primerjali z izidi presaditev KMC iz sorodnega

kostnega mozga ali periferne krvi. Rezultati so bili podobni pri vseh skupinah.<sup>18</sup>

Z uporabno PK je postalo iskanje ustreznih nesorodnih KMC za presaditev lažje. Mnogi avtorji menijo, da naj se iskanje darovalca KM ali enote PK načeloma začne hkrati, ter da naj ima presaditev PK (lahko je skladna ali celo neskladna v največ 2 antigenih HLA) prednost v primeru, če darovalca skladnega KM v registrih ne najdejo v doglednem času. Iskanje shranjene enote PK traja namreč največ nekaj tednov, iskanje in priprava nesorodnega darovalca pa lahko traja po več mesecev.

## Presaditve popkovnične krvi pri nemalighnih boleznih

S presaditvijo alogenskih KMC iz PK lahko zdravimo tudi nemaligne bolezni. Najprej so jih zdravili pri otrocih, za katere so nizki odmerki celic z jedrom iz PK zadostovali za presaditev. Zaradi manjše pojavnosti GvHD in ker pri teh boleznih ni potreben učinek presadka zoper levkemijo (GvL), je PK zelo primerna za zdravljenje nemalighnih boleznih.

## Podedovane hemolitične anemije

Najpogostejši prirojeni hemolitični anemiji sta talasemija in anemija srpastih celic, pri katerih gre za neustrezno sintezo sicer normalnega hemoglobina (talasemija) ali za sintezo okvarjenega hemoglobina (anemija srpastih celic). Večinoma gre pri obeh za okvaro posmeznega gena, ki se deduje avtosomno kodominantno. Ocenjujejo, da je kar 7 % ljudi nosilcev okvarjenih genov, ki so najpogostejši v Afriki in Sredozemju. Najbolj razširjena je talasemija. Učinkovitost presaditve KMC pri talasemiji še ni popolnoma raziskana, vendar se vedno bolj uveljavlja kot možnost zdravljenja. Locatelli s sodelavci poroča o 44 otrokih s talasemijo in anemijo srpastih celic, ki so imeli visoko stopnjo prijetja presadka (89 % na 60. dan) in dobro preživetje brez ponovitve bolezni (79 % za talasemijo in kar 90 % za anemijo srpastih celic).<sup>19</sup> Bernaudin in sod. so ugotovili, da 6 let po presaditvi tisti bolniki, ki so prejeli presadke alogenske PK, niso razvili bolezni GvHD, ki je sicer glavni vzrok smr-

tnosti.<sup>20</sup> Menijo, da je presaditev alogenskih KMC iz PK sorojenca zdravljenje prihodnosti za hemoglobinopatije, zato razmišljajo o uvedbi obveznega zbiranja in hranjenja PK pri vseh porodih v družinah s primeri teh bolezni.<sup>21</sup>

### Sindromi odpovedi kostnega mozga

Najpogostejše oblike odpovedi kostnega mozga so mielodisplastični sindrom (MDS), aplastična anemija in Fanconijeva anemija. Mielodisplastični sindrom je pridobljena klonska bolezen KMC, ki se kaže z napredujočo citopenijo ene, dveh ali treh celičnih vrst in se lahko konča z akutno mieloblastno anemijo. Mielodisplastični sindromi so v otroštvu redki, pogostejši so po 60. letu starosti. Pri otrocih je bolj pogosta bolezen odpovedi kostnega mozga aplastična anemija, Fanconijeva anemija pa je prirojena oblika aplastične anemije, ki se lahko konča z akutno levkemijo. Različne oblike odpovedi kostnega mozga že dolgo zdravijo s presaditvijo alogenskih KMC, vendar pri zdravljenju teh bolezni sorazmerno pogosto prihaja do zavrnitve presadka. Možni vzroki so večkratne predhodne transfuzije, okužbe med samo presaditvijo in okoliščina, da večina teh bolnikov pred postopkom ne prejema kemoterapije. Ker sama presaditev PK zaradi majhnega odmerka KMC povzroči kasnejše prijetje presadka, je bilo celokupno preživetje teh bolnikov (OS – overall survival) po presaditvi nesorodne PK v letih 1994–2005 nizko, še posebno pri MDS (okrog 35 %).<sup>15</sup> Ti rezultati se pri bolj sodobnih načinih zdravljenja izboljšujejo.

Kot je bilo že omenjeno v uvodu, je zdravljenje Fanconijeve anemije s presaditvijo KMC iz PK bolj uspešno, saj je preživetje brez ponovitve bolezni sorazmerno visoko, še posebej pri otrocih, ki prejmejo skladen presadek PK od sorodnika.<sup>22</sup> Gluckmanova in sod. so do l. 2007 presadili nesorodno PK 72 bolnikom s Fanconijevo anemijo in dosegli dober učinek pri 60 % bolnikov, pri čemer je bil uspeh večji pri tistih bolnikih, ki so bili kondicionirani s fludarabinom ali pa so prejeli večji odmerek CMV-negativnih KMC.<sup>23</sup>

Kot poročajo različni avtorji, so spodbudni tudi rezultati zdravljenja primarne imunske pomanjkljivosti<sup>24</sup> in določenih prirojelih napak presnove, npr. Hurlerjevega sindroma.<sup>25,26</sup>

### Spodbujanje prijetja presadka

Zapoznemo prijetje presadka zaradi manjših celičnih odmerkov in drugih vzrokov je glavna pomanjkljivost pri presaditvah PK, zato so razvili več strategij za spodbujanje prijetja presadka. V poštev pridejo boljši načini zbiranja PK, pomnoževanje KMC in izboljšanje vgnezditev presajenih celic v KM (homing). To lahko dosežemo s hkratno presaditvijo dveh ali več enot PK, z zmanjšano intenzivnostjo kondicioniranja s kemoterapijo, skupno presaditvijo s PK haploidnega darovalca ali z drugimi pomožnimi celicami, s presaditvijo neposredno v kostni mozeg in z namnoženjem celic *in vitro* (t.i. ekspanzija *ex-vivo*).<sup>27</sup> (Glej Tabela 1).

### Presaditve dveh ali več enot popkovnične krvi

Hkratno presaditev dveh enot PK je prvič izvedla raziskovalna skupina iz Minnesote in pomeni največji napredek v zadnjih letih na področju presaditve KMC.<sup>28,29</sup> S povečanjem celičnega odmerka izboljšamo prijetje presadka PK in obenem omogočimo presaditev PK pri odraslih bolnikih. Pri presaditvi dveh enot PK se v enem mesecu po presaditvi praviloma razraste in začne vzdrževati hematopoezo le ena od njiju, to je dominantna enota PK, medtem ko druga enota počasi izgine. Katera od obeh enot bo na koncu prevladala, ne moremo napovedati niti na osnovi števila celic, viabilnosti celic, vsebnosti limfocitov, ujemanja v HLA, krvne skupine ABO, spola ali zaporedja presaditve obeh enot. Vzrok za neuspešno prijetje ene od presajenih enot je verjetno zavrnitev, ki jo povzročijo CD8-pozitivne efektorske celice T, ki nastanejo iz naivnih prekurzorjev dominantne enote PK.<sup>30</sup>

Zanimivo je, da so dvojne presaditve PK za bolnike s tveganimi oblikami levkemije ali bolnike, ki niso dosegli remisije celo boljše od presaditve ene same enote, ki ima sicer

dovolj veliko število celic.<sup>13</sup> Obenem kaže, da so dvojne presaditve učinkovite tudi pri nemieloablativnem načinu zdravljenja, kar razširja njihovo uporabnost pri starejših in bolj prizadetih osebah, pri katerih je smrtnost zaradi samega postopka presaditve (TRM – transplant related mortality) sicer večja.<sup>28,31</sup>

### Zmanjšana intenzivnost kondicioniranja – nemieloablativno kondicioniranje

Ponavadi pred presaditvijo KMC osnovno bolezen zdravimo s kemoterapijo in obsevanjem, s čimer poleg rakavih celic uničimo tudi imunski sistem in kostni mozeg prejemnika. Tako obenem preprečimo, da bi prejemnikov imunski sistem zavrnil alogenski presadek. Ta običajni način imenujemo tudi *mieloablativno kondicioniranje*. Ta način je agresiven in ima številne stranske učinke, zato ga nekateri bolniki ne prenesejo. Za te bolnike lahko uporabimo presaditev KMC z zmanjšano intenzivnostjo kondicioniranja (»reduced intensity conditioning«–RIC). Ta način imenujemo tudi *nemieloablativno kondicioniranje*. Tak pristop je pogosto korišten za bolnike z določenimi nemalignimi boleznimi in malignimi boleznimi kronične narave, ki so bili pred tem zdravljeni s kemoterapijo.<sup>32,33</sup> Pri tem načinu presaditev je pogostnost GvHD primerljiva tisti pri presaditvah nesorodnega KM, razmeroma nizka je tudi smrtnost zaradi presaditve do 100. dneva po presaditvi, relapsi po akutnih levkemijah pa so bolj pogosti kot pri mieloablativnem zdravljenju. Metoda RIC je uspešna tudi pri otrocih.<sup>32</sup>

### Hkratna presaditev PK in KMC od haploidentičnega darovalca ali drugih pomožnih celic

Leta 2006 je Magro s sodelavci poročal o presaditvi skladne (identične) PK hkrati s KMC, dobljenimi iz periferne krvi stimuliranega haploidentičnega sorojenca. Rezultati pri 27 odraslih bolnikih so bili podobni tistim po presaditvah dveh skladnih enot PK. Opazovali so prehodno zgodnjo hematopoezo in hitrejše okrevanje nevtrofilcev

iz haploidentičnega presadka, kasneje so se obdržale le identične celice. Kar 69 % teh bolnikov z visokim tveganjem je preživel 4 leta.<sup>34</sup>

Na podlagi teh dognanj priporočajo za odrasle bolnike hkratno presaditev ene enote KMC iz PK, hkrati pa še ene enote KMC drugega (odraslega) dajalca, kar omogoči hitro okrevanje nevtrofilcev in visok odstotek prijetja PK.

V zadnjem času avtorji poiskujejo zmanjšati pojavnost GvHD tudi z dodatkom mezenhimskega matičnega celic (MMC), ki zaviralno učinkujejo na imunske reakcije. Gonzalo-Daganzo in sod. so devetim bolnikom presadili PK in KMC iz periferne krvi odraslega darovalca. Polovici bolnikov so hkrati infundirali še MMC iz kostnega mozga, pomnožene *ex-vivo*. Infuzije MMC so zmanjšale jakost akutne GvHD, niso pa vplivale na prijetje celic in na pojavnost GvHD, če so jih aplicirali preventivno.<sup>35</sup> Podobno so Bernardo in sod. nedavno trinajstletnemu otroku poleg skladne PK presadili še HLA-neskladne MMC, ki so jih darovali očetu, in pri njih dokazali nižjo smrtnost zaradi GvHD v primerjavi s kontrolno zgodovinsko skupino.<sup>36</sup> Te študije torej kažejo, da imajo MMC potencialno vrednost pri zdravljenju GvHD. V teku pa so tudi nove študije za zdravljenje aplastične anemije.<sup>37</sup>

### Znotrajkostna presaditev

KMC praviloma presadimo v obliki infuzije v veno, kar je zelo podobno transfuziji krvi. KMC se nato razporedijo v različnih organih, a le malo jih doseže niše v KM. Zato lahko neposredno vbrizganje KMC v dolge kosti pospeši prijetje presadka. Frassoni in sod. so med letoma 2006 in 2008 opravili 32 presaditev PK pri odraslih bolnikih z apliciranjem celic neposredno v kost, kar je omogočilo prijetje presadka kljub majhnemu številu KMC v PK. Poleg tega pride pri tem načinu dajanja KMC tudi do manjše pojavnosti bolezni GVHD, česar še ne znajo pojasniti.<sup>38</sup> Po drugi strani so Brunstein in sod. pri desetih odraslih bolnikih uporabili dve enoti KMC iz PK, od katerih so eno vbrizgali intravensko, drugo pa neposredno v kost, a niso dokazali značilno hitrejšega okrevanja

nevtrofilcev celic niti večjega celokupnega preživetja pri bolnikih z znotrajkostno presaditvijo.<sup>39</sup>

### Ekspanzija KMC iz popkovnične krvi »*ex vivo*«

Številne raziskave so pokazale, da je možno z dodatkom različnih rastnih dejavnikov KMC od 10-krat do 100-krat namnožiti zunaj telesa v laboratorijskem okolju (*ex-vivo*). Pri tem je značilno, da KMC iz PK bolj proliferirajo kot KMC iz kostnega mozga; verjetno zaradi tega, ker so mlajše.<sup>38</sup> Avtorji zato z namenom pridobiti ustrezno število KMC za presaditev razvijajo številne nove načine pomnoževanja celic iz PK *ex vivo*, pri čemer so dobili že zelo spodbudne klinične rezultate.<sup>40</sup> Pomagajo tudi podjetja, ki izdelujejo sterilne zaprte sisteme v kompletih za pomnoževanje *ex vivo*, ki omogočajo varno pomnoževanje CD34-pozitivnih KMC za klinično uporabo.<sup>41</sup>

KMC lahko med gojenjem v kulturi z rastnimi faktorji diferenciramo v različne vrste celic, na primer v megakariocite,<sup>42</sup> naravne celice ubijalke (NK) in v celice LAK (lymphokine-activated killer cytotoxic cells).<sup>43,44</sup> S slednjimi si obetajo zdraviti rakave bolezni. To pomeni, da bodo v bližnji prihodnosti iz KMC iz darovanih enot PK lahko *ex-vivo* vzgojili različne vrste vzgojenih limfocitov za adoptivno imunoterapijo rakavih bolezni.

## Uporaba popkovnične krvi za regenerativne namene

V PK se nahajajo poleg krvotvornih tudi MMC in še nekatere druge matične celice. Diferencijski potencial in proliferativni odgovor MMC iz placente je drugačen kot pri MMC iz kostnega mozga ali maščobnega tkiva.<sup>45</sup> MMC iz placente očitno vplivajo bolj zaviralno na imunski odgovor, kar je verjetno posledica njihovega učinka na celice T.<sup>46</sup> Le Blanc in sodelavci so dokazali, da MMC iz placente, ki jih vbrizgamo skupaj s presadkom KMC, pomagajo k hitrejšemu prijetju presadka.<sup>46,47</sup>

Novo področje raziskav je tudi uporaba MMC za obnovo tkiv, to je za namene regenerativne medicine. Dokazali so namreč, da so v PK prisotne tudi celice s pluripotentnimi diferencijskimi sposobnostmi.<sup>48</sup> Matične celice iz PK so uporabili že za regeneracijo miokarda in živčnih tkiv in dobili spodbudne rezultate tako *in vitro* kot *in vivo*.<sup>49-52</sup> Menijo, da bodo omogočile bistveni napredek v smislu izboljšanja krčljive funkcije in prekrvitve srca pa tudi pri tkivnem inženirstvu srčnih zaklopk.<sup>53-55</sup> Pri tem je potrebno poudariti, da se tehnike uporabe MC iz PK za regenerativne namene večinoma šele razvijajo in zato pričakujejo njihovo širšo uporabo šele po letu 2020.

Sama PK ima še druge uporabne lastnosti. Iz nje lahko npr. osamimo visoko število funkcionalnih dendritskih celic, ki so upo-

**Tabela 1:** Glavni problemi pri presaditvah PK in strategije za njihovo reševanje.

Problem	Strategija za reševanje
Zapoznelo prijetje presadka	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hkratna presaditve več kot ene enote PK</li> <li>• pomnoževanje CD34+ progenitorskih celic</li> <li>• nemieloablativno kondicioniranje pacienta</li> <li>• sočasna infuzija PK in haploidentičnih KMC iz periferne krvi</li> <li>• hkratna presaditev PK in MMC</li> <li>• znotrajkostna presaditev PK</li> </ul>
Okužbe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• agresivno zgodnje in predhodno zdravljenje</li> <li>• potencialna raba T-celic, specifičnih za patogene</li> </ul>
Ponovitev bolezni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• presaditev 2 enot PK pri bolnikih z akutno levkemijo</li> <li>• adoptivna imunoterapija:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– uporaba T-celic iz PK, ki izražajo himerne antigenske receptorje za tarčne malignosti B-celic</li> <li>– uporaba celic NK iz PK, namnoženih <i>ex vivo</i></li> <li>– NK celična imunoterapija kot del nove trojne presaditve PK</li> <li>– Infuzija limfocitov haploidentičnih darovalcev ( DLI=donor lymphocyte infusion ) pri presaditvah PK s haploidentičnimi KMC</li> </ul> </li> </ul>

rabne za adoptivno celično zdravljenje,<sup>56</sup> lahko pa jo predelamo tudi v trombocitni gel, ki vsebuje visoko koncentracijo rastnih dejavnikov, uporabnih v regenerativni medicini.<sup>57</sup>

## Uporaba matičnih celic iz popkovnične krvi v Sloveniji

V Sloveniji smo prvo zbiranje PK za sorodniško alogensko presaditev na pobudo Hematološko-onkološkega oddelka Pediatrične klinike leta 1999 izvedli strokovnjaki ljubljanske Porodnišnice in Zavoda RS za transfuzijo, vendar do klinične presaditve kasneje ni prišlo. Šele leta 2004 smo prvič opravili alogensko nesorodniško presaditev PK, ki je prišla iz avstralske banke popkovnične krvi v Sydneyu. Leta 2008 je bila opravljena druga nesorodna presaditev alogenske PK. V obeh primerih sta bila bolnika majhna otroka z maligno krvno boleznijo. Presajeni enoti PK sta bili HLA-skladni na vseh šestih testiranih lokusih (skladje 6/6). V obeh primerih je presaditev potekala brez večjih zapletov, le čas do vgnezditev je bil podaljšan v primerjavi s presaditvami alogenskih KMC nesorodnih dajalcev, kar je pričakovan pojav. Pojava bolezni GvHD nismo opazili pri nobenem od obeh malih bolnikov, žal pa je pri obeh kasneje prišlo do ponovitve osnovne hematološke bolezni.

## Kako izbrati ustrezno enoto popkovnične krvi v različnih kliničnih pogojih

Celični odmerek PK je odvisen od stopnje skladnosti med bolnikom in dajalcem, vrste bolezni (maligna ali nemaligna) ter od tega, ali za presaditev uporabljamo eno ali dve enoti PK. Omenili smo že, da je glavna prednost PK pri malignih boleznih nizka stopnja pojavnosti bolezni GvHD, čeprav je presadek HLA-neskladen, njena glavna pomanjkljivost pa je zapoznelo prijetje presadka zaradi omejenih celičnih odmerkov. Optimalna izbira enote PK lahko pomaga najti ravnovesje med temi lastnostmi in tako pomaga izboljšati izide presaditev PK. Gluckmanova s sodelavci<sup>58,59</sup> ter Wall in Chan<sup>60</sup>

menijo, naj bi se bolnik in enota PK ujemala vsaj v 4/6 antigenih HLA na HLA-A, -B in -DRB1 lokusih, minimalni celični odmerek pa naj bi bil več kot  $2,5 \times 10^7$  celic z jedrom/kg telesne mase bolnika. Če je na voljo več enot PK z isto stopnjo ujemanja v antigenih HLA, naj bi izbrali tisto z ujemanjem v DRB1 in tisto, ki vsebuje več celic z jedrom. Presaditve dveh enot PK povečajo tudi učinek GvL, kar zaenkrat še vedno odpira vprašanje, ali naj ima presaditev z dvema enotama PK prednost pred posamično enoto PK z dovolj velikim celičnim odmerkom.

V nasprotju z opisanim zdravljenjem malignih bolezni je pri nemalignih boleznih ključnega pomena za prijetje presadka in preživetje visoka skladnost v antigenih HLA, ki prepreči nastanek GvHD, manj pomembno pa je *število oz. odmerek* presajenih celic. Zato priporočajo izbrati enote, ki so najbolj skladne v antigenih HLA, *šele nato pa upoštevati tudi število celic*, ki naj bi bilo vsaj vsaj  $3,5 \times 10^7$ /kg celic z jedrom. Trenutno kaže, da so presaditve dveh enot PK za bolnike z nemalignimi boleznimi *še vedno* preveč tvegane.<sup>15</sup>

## Zaključek

Izkušnje zadnjih 20 let kažejo, da je presaditev KMC iz PK postala ustrezna alternativa presaditvam KMC iz KM ali periferne krvi. Ta presaditev je torej postala standardno zdravljenje, ki se vse bolj širi. Priporočajo jo tako za otroke kot tudi za odrasle bolnike. Njena največja omejitev v vseh kliničnih pogojih in pri vseh starostnih skupinah pa je sorazmerno majhno število kliničnih študij, ki bi primerjale uspeh presaditve KMC iz kostnega mozga, periferne krvi in PK.<sup>5</sup>

## Zahvala

Članek je nastal tudi ob pomoči nacionalnega raziskovalnega programa P3-0371 Človeške matične celice-napredno zdravljenje s celicami, ki ga sofinancira ARRS – Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

## Literatura

1. Rožman P, Jež M. Matična celica in napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo. Slovar. DCTIS–Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije April 2010. Available from: [http://www.dctis.org/terminoloski\\_koticek/slovar.pdf](http://www.dctis.org/terminoloski_koticek/slovar.pdf)
2. McGuckin CP, Basford C, Hanger K, Habibollah S, Forraz N. Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Hum Dev* 2007; 83: 733–41.
3. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918)* 1972; 99: 276–80.
4. 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: 1174–8.
5. Stanevsky A, Goldstein G, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation: pros, cons and beyond. *Blood Rev* 2009; 23: 199–204.
6. Shaw BE, Arguello R, Garcia-Sepulveda CA, Madrigal JA. The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2010; 150: 251–8.
7. Nitsche A, Zhang M, Clauss T, Siegert W, Brune K, Pahl A. Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. *BMC Immunol* 2007; 8: 18.
8. Dalle JH, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, Duval M. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* 2005; 57: 649–55.
9. Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 555–63.
10. Stem Cell Donor Registries Annual Report 2009. World Marrow Donor Association; 2010.
11. EBMT Data Base. In: The European Group for Blood and Marrow Transplantation; 2010.
12. Gratwohl A, Baldomero H. European survey on clinical use of cord blood for hematopoietic and non-hematopoietic indications. *Transfus Apher Sci* 2010; 42: 265–75.
13. Stanevsky A, Shimoni A, Yerushalmi R, Nagler A. Double umbilical cord blood transplant: more than a cell dose? *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 975–82.
14. Wall DA, Carter SL, Kernan NA, Kapoor N, Kamani NR, Brochstein JA, et al. Busulfan/melphalan/antithymocyte globulin followed by unrelated donor cord blood transplantation for treatment of infant leukemia and leukemia in young children: the Cord Blood Transplantation study (COBLT) experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 637–46.
15. Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(5): 565–70.
16. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. *Semin Hematol* 2005; 42: 85–90.
17. Gluckman E. Cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 808–12.
18. Takahashi S, Yamaguchi T, Ooi J, Tomonari A, Tsukada N, Konuma T, et al. The comparative analysis of bone marrow transplantation and cord blood transplantation from unrelated donors in patients with myelodysplastic syndrome in Japan. *Blood* 2007; 110: 2012.
19. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003; 101: 2137–43.
20. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007; 110: 2749–56.
21. Boncimino A, Bertaina A, Locatelli F. Cord blood transplantation in patients with hemoglobinopathies. *Transfus Apher Sci* 2010; 42: 277–81.
22. Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD, Nagler A, Loewenthal R, Rechavi G, Toren A. Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor. *Am J Hematol* 2004; 77: 397–9.
23. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, Bierings M, Harris RE, Wagner J, et al. Results of unrelated cord blood transplant in fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1073–82.
24. Smith AR, Gross TG, Baker KS. Transplant Outcomes for Primary Immunodeficiency Disease. *Semin Hematol* 2010; 47: 79–85.
25. Staba SL, Escolar ML, Poe M, Kim Y, Martin PL, Szabolcs P, Allison-Thacker J, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med* 2004; 350: 1960–9.
26. Stein J, Garty BZ, Dror Y, Fenig E, Zeigler M, Yaniv I. Successful treatment of Wolman disease by unrelated umbilical cord blood transplantation. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 663–6.
27. Rocha V, Broxmeyer HE. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(1 Suppl): S126–S132.
28. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Miller JS, Blazar BR, McClave PB, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 2007; 110: 3064–70.
29. Brunstein CG, Weisdorf DJ. Future of cord blood for oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 699–707.
30. Gutman JA, Turtle CJ, Manley TJ, Heimfeld S, Bernstein ID, Riddell SR, Delaney C. Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit. *Blood* 2010; 115: 757–65.
31. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010; 116: 4693–9.
32. Del Toro G., Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid BM, George D, et al. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood



- and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 613–22.
33. Bradley MB, Satwani P, Baldinger L, Morris E, van de Ven C, Del TG, Garvin J, et al. Reduced intensity allogeneic umbilical cord blood transplantation in children and adolescent recipients with malignant and non-malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 621–31.
  34. Magro E, Regidor C, Cabrera R, Sanjuan I, Fores R, Garcia-Marco JA, et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica* 2006; 91: 640–8.
  35. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* 2009; 11: 278–88.
  36. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 200–7.
  37. Jaganathan BG, Tisato V, Vulliamy T, Dokal I, Marsh J, Dazzi F, Bonnet D. Effects of MSC co-injection on the reconstitution of aplastic anemia patient following hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2010; 24(10): 1791–5.
  38. Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, Raiola AM, Ibatucci A, Piaggio G, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 831–9.
  39. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, McKenna D, Chong SY, et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 935–40.
  40. Brunstein CG, Laughlin MJ. Extending Cord Blood Transplant to Adults: Dealing With Problems and Results Overall. *Semin Hematol* 2010; 47: 86–96.
  41. Astori G, Larghero J, Bonfini T, Giancola R, Di RM, Rodriguez L, et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood CD34 cells in a closed system: a multicentric study. *Vox Sang* 2006; 90: 183–90.
  42. De Bruyn C, Delforge A, Martiat P, Bron D. Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells: cord blood versus mobilized peripheral blood. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 415–24.
  43. Ayello J, van de Ven C, Fortino W, Wade-Harris C, Satwani P, Baxi L, et al. Characterization of cord blood natural killer and lymphokine activated killer lymphocytes following ex vivo cellular engineering. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 608–22.
  44. Ayello J, van de Ven C, Cairo E, Hochberg J, Baxi L, Satwani P, Cairo MS. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp Hematol* 2009; 37: 1216–29.
  45. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294–301.
  46. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, Mao N. Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 2005; 15: 539–47.
  47. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; 21: 1733–8.
  48. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008; 26(1): 146–50.
  49. Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, Li W, et al. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 2006; 38: 771–3.
  50. Arien-Zakay H, Nagler A, Galski H, Lazarovici P. Neuronal conditioning medium and nerve growth factor induce neuronal differentiation of collagen-adherent progenitors derived from human umbilical cord blood. *J Mol Neurosci* 2007; 32: 179–91.
  51. Ruvinov E, Sharabani-Yosef O, Nagler A, Einbinder T, Feinberg MS, Holbova R, et al. Transplantation of genetically engineered cardiac fibroblasts producing recombinant human erythropoietin to repair the infarcted myocardium. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1: 7.
  52. Arien-Zakay H, Lecht S, Bercu MM, Amariglio N, Rechavi G, Galski H, et al. Interferon-gamma-induced neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived progenitors. *Leukemia* 2009; 23: 1790–800.
  53. Greco N, Laughlin MJ. Umbilical cord blood stem cells for myocardial repair and regeneration. *Methods Mol Biol* 2010; 660: 29–52.
  54. Ichim TE, Solano F, Lara F, Rodriguez JP, Cristea O, Minev B, et al. Combination stem cell therapy for heart failure. *Int Arch Med* 2010; 3: 5.
  55. Sodian R, Schaefermeier P, Abegg-Zips S, Kuebler WM, Shakibaei M, Daebritz S, et al. Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves. *Ann Thorac Surg* 2010; 89: 819–28.
  56. Balan S, Kale VP, Limaye LS. A large number of mature and functional dendritic cells can be efficiently generated from umbilical cord blood-derived mononuclear cells by a simple two-step culture method. *Transfusion* 2010; 50: 2413–23.
  57. Parazzi V, Lazzari L, Rebulli P. Platelet gel from cord blood: a novel tool for tissue engineering. *Platelets* 2010; 21: 549–54.
  58. Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *Br J Haematol* 2009; 147: 192–9.
  59. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica* 2009; 94: 451–4.
  60. Wall DA, Chan KW. Selection of cord blood unit(s) for transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 1–7.