

## Terapia komórkowa

(w świetle doniesień prezentowanych na 21. Regionalnym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi [ISBT] w Lizbonie 18–22 czerwca 2011 roku)

Ryszard Poglód, Jolanta Antoniewicz-Papis, Elżbieta Lachert

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

### Nowe spojrzenie na programy mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych i ich kliniczne zastosowanie

Prezentowane w czasie trwania kongresu kliniczne prace o terapiach komórkowych i przeszczepianiu krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) dotyczyły między innymi skuteczności pleriksaforu stosowanego po uprzednio nieudanych mobilizacjach oraz poszukiwania skutecznych programów mobilizujących KKM u chorych na szpiczaka mnogiego leczonych lenalidomidem. Dla lekarza interesujące mogą się okazać także doniesienia o skuteczności autologicznego przeszczepienia KKM w ciężkiej aplazji szpiku oraz dążenia do optymalizacji procesu pobierania KKM. Na szczególną uwagę zasługują prace poświęcone analizom występujących u dawców niepożądanych reakcji związanych z pobieraniem KKM ze szpiku i krwi obwodowej, zwłaszcza te, które uwzględniały odległy wpływ programów mobilizacyjnych na zdrowie dawcy.

Należy podkreślić, że zainteresowaniem badaczy nadal cieszy się mobilizacja KKM przy użyciu pleriksaforu. Środek ten blokuje interakcję między chemokiną CXCR4 a czynnikiem wzrostu komórek macierzystych SDF1- $\alpha$  powodując uwalnianie KKM do krwiobiegu, wzmacnia też efekt G-CSF. Pleriksafor stosowany jest obecnie z powodzeniem u pacjentów, u których w poprzedniej mobilizacji nie udało się zgromadzić odpowiedniej liczby komórek CD34+. W badaniu Rodrigues i wsp. [1] oceniano skuteczność pleriksaforu w uwalnianiu KKM do krwi obwodowej u chorych, u których nie powiodła się poprzednia mobilizacja. Dotyczy to tej grupy chorych, u których po uprzedniej mobilizacji samym G-CSF lub w skojarzeniu z cyklofosfamidem bądź wieloskładnikową chemioterapią, zgromadzono

w czasie dwóch zabiegów leukaferozy (LP)  $< 2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg mc.

Badaną grupę stanowiło 17 pacjentów, u których, jak wspomniano wcześniej, pierwsza mobilizacja była nieudana. Dziewięciu chorych poddano drugiej mobilizacji, podczas której w dniu 5. na 11 godzin przed zabiegiem LP podawano pleriksafor wraz z G-CSF. W tej grupie 9 chorych w wieku 25–64 lat (średnia wieku 54) było 6 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozowego (MM, *multiple myeloma*), 2 — chłoniaka nieziarniczego (NHL, *non Hodgkin lymphoma*) i 1 — chłoniaka Hodgkina (HL, *Hodgkin's lymphoma*). Zabiegi LP, trwające 3–5 godzin wykonywano przy użyciu separatora z przepływem ciągłym CS 3000+ (Fenwal, Stany Zjednoczone AP). Separacji poddawano 2–3 objętości krwi. U każdego chorego dwukrotnie wykonywano badanie morfologii krwi i oznaczenie liczby komórek CD34+ — przed i po zabiegu LP. Po każdym zabiegu LP wykonywano rutynową kontrolę jakości koncentratów KKM, oznaczano liczbę komórek CD34+, liczbę komórek jądrzastych i jednojądrzastych, krwinek płytkowych oraz hematokryt. Oceniano także żywotność komórek i wykonywano badania bakteriologiczne. U 7/9 chorych (77,8%) mobilizacja okazała się skuteczna.

U wszystkich osób poddanych mobilizacji stwierdzono korelację między liczbą komórek CD34+ we krwi obwodowej i w uzyskanym preparacie. Lek był dobrze tolerowany przez wszystkich chorych. Objawy niepożądane obserwowano rzadko i miały one charakter łagodny i przemijający.

Na podstawie przeprowadzonej analizy autorzy stwierdzili, że mobilizacja pleriksaforem była nieskuteczna u pacjentów poddanych uprzednio intensywnej i długotrwałej chemioterapii. Doszli także do wniosku, że podawanie pleriksaforu w skojarze-

niu z innymi lekami stosowanymi w programach mobilizacji umożliwia 2,8–10,7-krotne zwiększenie liczby komórek CD34+ we krwi obwodowej przed pierwszym zabiegiem LP; autorzy podtrzymują również opinię o istotnej roli tego czynnika w mobilizacji komórek po uprzednich mobilizacjach nieskutecznych.

Celem podobnego badania, przeprowadzonego przez tych samych autorów [2] była ocena skuteczności pleriksaforu w uwalnianiu KKM do krwi obwodowej u chorych poddanych pierwszej mobilizacji, gdy liczba komórek CD34+ była niższa niż 20/ $\mu$ l. Pleriksafor w skojarzeniu z lekami ze stosowanego programu mobilizacji podawano wieczorem, na 11 godzin przed rozpoczęciem zabiegu LP, wówczas gdy liczba komórek CD34+ we krwi obwodowej wynosiła 20/ $\mu$ l. Mobilizację uznawano za udaną, jeśli w dwóch zabiegach LP otrzymano 2–4  $\times$  10<sup>6</sup> komórek CD34+/kg mc. tj. liczbę komórek wystarczającą do wykonania przeszczepienia, odpowiednio pojedynczego lub tandemowego. Przeszczepienie tandemowe stosowano u chorych na MM. Ocenie poddano 12 chorych podzielonych na dwie grupy w zależności od programu mobilizacji. Grupa pierwsza obejmowała 7 chorych [5 mężczyzn, 2 kobiety w wieku 46–68 lat (średnia wieku 57,1), 4 z rozpoznaniem MM, i 3 — z NHL] mobilizowanych przy użyciu skojarzonego programu G-CSF + pleriksafor, u których w 5. dniu wykonywano zabieg LP. Grupa druga obejmowała 5 chorych [4 mężczyzn i 1 kobieta (średnia wieku 58), wszyscy z rozpoznaniem MM], u których w mobilizacji stosowano cyklofosfamid + G-CSF + pleriksafor. Zabieg LP wykonywano w 10. dniu. U wszystkich pacjentów w trakcie pojedynczego 3–5-godzinnego zabiegu LP przy użyciu separatora CS 3000+ separacji poddawano 2–3 całkowite objętości krwi krążącej. Przed i po każdym zabiegu LP wykonywano badanie morfologii krwi i liczby komórek CD34+.

W swoich wnioskach autorzy podkreślają, że u 75% pacjentów mobilizacja komórek CD34+ kończyła się pomyślnie. U 2 innych chorych na MM zebrano komórki CD34+ w liczbie wystarczającej tylko na jeden zabieg przeszczepienia. W badaniu zaobserwowano, że pleriksafor podawany w skojarzeniu z lekami z programu mobilizacji powodował 1,6–18,1-krotny wzrost liczby komórek CD34+ przed zabiegiem LP. Wyniki te potwierdzają przydatność stosowania pleriksaforu u pacjentów gorzej mobilizujących KKM oraz w sytuacji kiedy potrzebna jest podwójna dawka komórek CD34+ do przeszczepienia tandemowego u chorych na MM. Autor uważa, że konieczne jest jednak prowadzenie dalszych badań.

Kolejnym interesującym zagadnieniem jest poszukiwanie skutecznej terapii mobilizującej KKM, ale bez użycia pleriksaforu, u chorych na MM leczonych lenalidomidem. Wyrażana jest opinia, że lenalidomid niekorzystnie wpływa na powodzenie mobilizacji KKM. Grubovikij i wsp. [3] podkreślają, że nieodzownym warunkiem powodzenia transplantacji autologicznej jest odpowiednia mobilizacja KKM i zebranie ich we właściwym czasie przed przeszczepieniem. Mobilizacja KKM u pacjentów uprzednio długo i intensywnie leczonych chemioterapią często bywa nieefektywna. Może okazać się również nieskuteczna u chorych na MM leczonych lenalidomidem. Autorzy badania prowadzonego w latach 2008–2011 w Klinice Hematologii Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles (Stany Zjednoczone AP) przedstawili swoje doświadczenia z mobilizacją, pobieraniem i przeszczepianiem KKM u chorych na MM leczonych tym lekiem. Z analizy tej wyłączono chorych z niewydolnością nerek. Minimalną liczbą komórek zapewniającą pomyślne przeszczepienie jest wartość 2  $\times$  10<sup>6</sup> komórek CD34+/kg mc., zaś optymalną dawkę stanowi wartość 5  $\times$  10<sup>6</sup> komórek CD34+/kg mc. Separacji komórek dokonywano przy użyciu systemu Cobe Spectra (Caridian BCT, Stany Zjednoczone AP); Zabiegowi LP poddawano 2–2,5 całkowitej objętości krwi krążącej. Wszystkich chorych objęto programem pojedynczej mobilizacji, w skład którego wchodziły G-CSF, cyklofosfamid i prednison. Przeszczepienie autologicznych KKM uzyskanych z krwi obwodowej przeprowadzono u 103 chorych na MM, po uprzednim kondycjonowaniu wysoko dawkowanym melfalanem. Wykonano łącznie 212 zabiegów aferezy, średnio 2 u każdego chorego. Stwierdzono, że leczenie lenalidomidem przed terapią poprzedzającą przeszczepienie nie miało znaczącego wpływu na liczbę wykonanych procedur aferezy ani na liczbę uzyskanych komórek CD34+. Autorzy uważają, że zastosowana przez nich metoda mobilizacji KKM u chorych na MM jest skuteczna i łatwa do przeprowadzenia. Skojarzenie G-CSF, cyklofosfamid i prednizonu wydaje się doskonałą strategią mobilizacji o nieznaczej (< 1%) liczbie niepowodzeń. Pobrana i przetoczona liczba komórek CD34+ przekraczała wartość optymalną wynoszącą 5  $\times$  10<sup>6</sup> komórek CD34+/kg mc. U nikogo z chorych poddanych zabiegowi przeszczepienia nie zaobserwowano jakichkolwiek niepożądanych reakcji, a odbudowa układu krwiotwórczego następowała szybko.

Ciekawym doniesieniem była praca na temat leczenia ciężkiej niedokrwistości aplastycznej (sAA, *severe aplastic anaemia*) metodą przeszczepienia autologicznych KKM [4]. Jest to nadal podejście

innowacyjne. Autorzy donoszą o przypadku sAA u mężczyzny, u którego najpierw zastosowano leczenie immunosupresyjne z użyciem ATG króliczej i cyklosporyny A. Po drugim cyklu leczenia immunosupresyjnego liczba komórek wielojądrzastych wzrosła do wartości powyżej  $2,0 \times 10^9/l$ . Zastosowano wówczas mobilizację z użyciem G-CSF zwiększając dawkę z 5 do  $16 \mu g/kg/mc$ . dzień. Wykonano dwa zabiegi LP, a następnie przeszczepiono autologiczne KKM. Efekt kliniczny okazał się bardzo pomysłny. Autorzy sugerują, że w przypadku sAA liczba komórek CD34+/CD90+ we krwi obwodowej może stanowić lepszy wskaźnik prognostyczny niż całkowita liczba komórek CD34+. Większa liczba komórek o takiej koekspresji w preparacie komórkowym może poprawić skuteczność leczenia za pomocą przeszczepienia autologicznych KKM.

Z kolei autorzy innej pracy zwracają uwagę na zastosowanie KKM od dawców haploidentycznych [5]. Uwzględniając fakt, że tylko 25% chorych ma dawcę rodzinnego identycznego pod względem HLA, a poszukiwanie zgodnego dawcy niespokrewnionego jest niezwykle czasochłonne, coraz częściej jako alternatywne źródło tych komórek stosuje się KKM, pobrane metodą aferezy (PBSC, *peripheral blood stem cells*) od haploidentycznych dawców. Celem pracy była ocena wyników leczenia chorych dorosłych przy użyciu przeszczepów haploidentycznych. Badanie prowadzone przez 11 lat objęło 28 mężczyzn i 23 kobiety (średnia wieku 32), u których rozpoznano ostrą białaczkę szpikową (25), niedokrwiistość aplastyczną (6), ostrą białaczkę limfoblastyczną (4), przewlekłą białaczkę szpikową (4), chłoniaka nieziarniczego (3), zespoły mielodysplastyczne (3), szpiczaka mnogiego (2), przewlekłą białaczkę limfocytową (2) chłoniaka Burkitta (1). Wszyscy chorzy otrzymywali komórki CD34+ otrzymane metodą aferezy, wyizolowane z użyciem pozytywnej selekcji komórek CD34+ przy użyciu systemu CliniMACS. Autorzy stwierdzili, że istotną kwestią w przypadku przeszczepów haploidentycznych jest określenie liczby komórek progenitorowych koniecznych do bezpiecznej odbudowy układu krwiotwórczego. Dzięki zastosowaniu systemu CliniMACS uzyskano komórki CD34+ o wysokiej czystości, a liczba przetoczonych komórek T nie przekraczała wartości progowej do wywołania GVHD (*graft versus host disease*).

### **Reakcje i zdarzenia niepożądane u dawców KKM**

Kolejnym niezwykle istotnym zagadnieniem związanym z terapiami komórkowymi jest wystę-

powanie reakcji niepożądanych u dawców KKM po zabiegu pobrania szpiku (BM, *bone marrow*) lub krwi obwodowej [6]. Na podstawie analizy częstości występowania nowotworów złośliwych u dawców KKM w porównaniu z liczbą allogeniczych przeszczepień KKM wykonanych w ostatnich dekadach wynika, że liczba nowotworów układu krwiotwórczego występujących u dawców jest niewielka. Pojawia się jednak kwestia czułości stosowanych obecnie metod wykrywania komórek nowotworowych. Być może należałoby stosować bardziej czułe techniki wykrywania takich komórek, zwłaszcza gdy wzrośnie liczba par dawca/biorca w starszym wieku. Wiadomo, że w miarę starzenia się organizmu wzrasta możliwość pojawienia się ukrytego nowotworu. Wykazano, że odsetek wznowy choroby nowotworowej był wyższy u biorców KKM, pochodzących od dawców, u których po donacji KKM rozwinął się nowotwór [6, 7].

W przypadku dawców spokrewnionych ryzyko rozwoju chorób rozrostowych układu krwiotwórczego oraz gammopatii monoklonalnej i monoklonalnej limfocytozy B komórkowej jest ponad dwukrotnie większe. W chwili obecnej nie ma jednolitych wytycznych dotyczących postępowania z dawcą i kandydatem na dawcę KKM. Jedynie w programie *National Marrow Donor Program* (NMDP) wymagane jest wykonanie ogólnej analizy białek krwi u dawcy przed kwalifikacją do pobrania materiału przeszczepowego. W żadnych innych wytycznych nie zaleca się wykonywania bardziej czułych badań w kierunku obecności białka monoklonalnego ani immunofenotypowania komórek krwi obwodowej. Nieznany jest odległy efekt podawania G-CSF na zachowanie monoklonalnych limfocytów B i plazmocytów, stąd w niektórych ośrodkach, dla dobra dawcy, zaleca się rozważne powstrzymanie się od pobierania KKM z krwi obwodowej na korzyść komórek uzyskanych ze szpiku. W cytowanej przez autorów omawianego artykułu pracy Niederwiesera i wsp. [8] sugeruje się wykonywanie badań w kierunku obecności białka monoklonalnego zarówno u dawcy, jak i biorcy, natomiast nie zaleca się wykonywania badań szpiku u dawcy, chyba że w wywiadzie rodzinnym stwierdzono nowotwory. W niektórych ośrodkach sugerowane jest wykonywanie badania aspiracyjnego szpiku u wszystkich spokrewnionych dawców w starszym wieku.

Organizacje odpowiedzialne za opiekę nad dawcami niespokrewnionymi stosują politykę zerowego ryzyka i podają ściśle wytyczne dla ośrodków dawców. Brakuje jednak wspólnych zaleceń dotyczących wykrywania ukrytych patologii i ich wpływu na podejmowanie decyzji o dyskwalifikacji dawców.



Autorzy prezentowanych prac wskazywali na różnice w traktowaniu dawców rodzinnych spokrewnionych (zalecenia mniej restrykcyjne) i niespokrewnionych (zalecenia bardziej restrykcyjne) oraz na ewentualne konsekwencje takiego postępowania. Zwrócono uwagę [7] na brak jednolitego podejścia do dawców spokrewnionych i niespokrewnionych pod względem: rekrutacji, badań, kwalifikacji dawcy, raportowania wczesnych i odległych działań niepożądanych oraz długości okresu opieki nad dawcą (*follow-up*). Wytyczne opracowane przez *Joint Accreditation Committee of the ISCT and EBMT* (JACIE), *World Marrow Donor Association* (WMDA) i *National Marrow Donor Program* (NDMP) są ukierunkowane na dawców niespokrewnionych i mimo że istnieją takie zalecenia dla dawców spokrewnionych, to nie opracowano dotychczas ogólnych wytycznych.

Wytyczne dotyczące dawców spokrewnionych mają charakter raczej lokalny i są opracowywane przez poszczególne ośrodki. Autorzy porównali opublikowane wytyczne dotyczące dawców spokrewnionych i niespokrewnionych. Różnice w zakresie rekrutacji wydają się oczywiste, ponieważ dawcy spokrewnieni mają silniejszą motywację odzyskania KKM i podjęcia związanego z tym ryzyka.

Zwrócono uwagę na coraz częstsze wykonywanie zabiegów przeszczepiania KKM u starszych biorców, których rodzeństwo jest również w starszym wieku. Zdarza się często, że dawca spokrewniony, zgodny z biorcą w układzie HLA, zostaje zakwalifikowany jako dawca jeszcze przed uzyskaniem dokładnej informacji o stanie jego zdrowia. W badaniu kohortowym stwierdzono, że wiek dawców spokrewnionych zawsze przewyższa wiek dawców niespokrewnionych, a ściśle wyznaczona górna granica wieku dawcy spokrewnionego zasadniczo nie istnieje. Ostateczna akceptacja takiego dawcy do zabiegu często zależy od lekarza, który jest jednocześnie członkiem zespołu przeszczepowego. Należy pamiętać, że starszy wiek dawcy częściej wiąże się z ryzykiem występowania dodatkowych chorób, przede wszystkim układu sercowo-naczyniowego (choroba wieńcowa, nadciśnienie), otyłości czy cukrzycy. W serii analiz dotyczących dawców rodzinnych wykazano częstsze występowanie chorób współistniejących u dawców w starszym wieku.

Podobną różnicę pomiędzy dawcami spokrewnionymi a niespokrewnionymi stwierdzono w podejściu do wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*) dawcy. U dawców niespokrewnionych wartość BMI nie może przekraczać 40, natomiast takiego ograniczenia nie stosuje się w przypadku dawców spokrewnionych. Otyłość może się wiązać ze współ-

istnieniem innych chorób, a także z koniecznością zakładania wkłucia centralnego. Stwierdzono, że u dawców rodzinnych częściej stosuje się wkłucie centralne w celu przeprowadzenia zabiegu aferezy. Podobna sytuacja występuje w związku z przyjmowaniem przez dawców leków w przypadku takich chorób przewlekłych, jak choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca; natomiast u dawców niespokrewnionych przyjmowanie leków jest przyczyną ich dyskwalifikacji.

Różnica dotyczy także prowadzenia odległej obserwacji po pobraniu KKM. W przypadku dawców rodzinnych prowadzenie takiej obserwacji nie jest obowiązkowe. U podstaw różnic w traktowaniu dawców spokrewnionych i niespokrewnionych mogą leżeć zarówno czynniki finansowe, jak i logistyczne, jednak niektóre wytyczne dotyczące dawców spokrewnionych mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie w przypadku dawców niespokrewnionych.

Ostatnim analizowanym zagadnieniem była częstość występowania reakcji niepożądanych u dawców po pobraniu KKM. Przeprowadzono metaanalizę na podstawie 6 badań obejmujących 807 dawców. Porównywano wpływ pobrania szpiku i KKM z krwi obwodowej na występowanie u dawcy krótkotrwałego bólu i psychicznego cierpienia. W przypadku pobrania KKM z krwi obwodowej intensywność objawów była bardziej nasiloną przed zabiegiem uzyskania KKM, a w przypadku pobrania szpiku nasilenie takich objawów było większe po zabiegu. Jednak autorzy samokrytycznie stwierdzają, że badanie takie ma wartość ograniczoną, o ile nie stosuje się jednolitej oceny jakości życia i po badaniu nie prowadzi długotrwałej obserwacji typu *follow-up*. Dotychczas zarówno pobieranie KKM ze szpiku i krwi obwodowej uznawane jest za procedurę bezpieczną, o niewielkiej liczbie poważnych reakcji niepożądanych, czyli takich, które zagrażają życiu. Jednak w przypadku pobierania KKM z krwi obwodowej potencjalnie niebezpieczne reakcje niepożądane mogą być znacznie poważniejsze. I tak, u wszystkich dawców poddawanych mobilizacji obserwowano na przykład powiększenie śledziny o 10%. U 1/3 dawców wystąpiło powiększenie śledziny o ponad 20%, tego rodzaju splenomegalia ustępowała jednak po 3–7 dniach. W przeciwieństwie do badań na modelach zwierzęcych, stopień powiększenia śledziny u ludzi nie jest jednoznacznie związany z liczbą krwinek białych, rasą, płcią czy wiekiem dawcy. Należy wszakże pamiętać, że analizowane grupy nie były zbyt liczne, w związku z czym wyników badań nie można traktować jako podstawy do wysnuwania wiążących wniosków. Inne często występujące objawy subkliniczne to utrzymujące się

(do 2 tygodni po zabiegu LP) małopłytkowość oraz leukopenia (bez objawów zakażenia, ale utrzymująca się nawet przez 2 lata). Do śmiertelnych lub zagrażających życiu powikłań związanych z pobieraniem KKM z krwi obwodowej zalicza się: zatrzymanie czynności serca, wstrząs anafilaktyczny, ostre uszkodzenie płuc, zespół przesączania włósniczkowego, rabdomiolizę, pęknięcie śledziony, udar i powikłania zakrzepowe.

W dużym retrospektywnym badaniu *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) ocenie poddano ponad 50 tysięcy donacji KKM z krwi obwodowej i szpiku, z których 70% pochodziło od dawców spokrewnionych. Cztery z 5 obserwowanych powikłań śmiertelnych (wszystkie u dawców spokrewnionych) wystąpiły po pobraniu KKM z krwi obwodowej. Ciężkie objawy uboczne obserwowano u 37 dawców. Stwierdzono 10 powikłań sercowo-naczyniowych, 8 zakrzepowo-zatorowych, 5 pęknięć śledziony, 3 krwawienia, 2 powikłania płucne oraz 8 innych, a częstość ich była dwukrotnie większa niż u dawców szpiku. Reakcje te występowały głównie u dawców spokrewnionych. U dawców niespokrewnionych nie obserwowano powikłań śmiertelnych, a częstość reakcji zagrażających życiu była mniejsza. Reakcje niepożądane wymagające wszczęcia procedur diagnostycznych lub hospitalizacji wystąpiły u 0,5–2% dawców. Autorzy prac [6, 7] podkreślają, że w ostatnich latach WMDA/NMDP wprowadziły system rejestrowania ciężkich zdarzeń/reakcji niepożądanych (SAE, *serious adverse events/SAR, serious adverse reactions*) u dawców niespokrewnionych; wymagania wobec dawców spokrewnionych nie są aż tak restrykcyjne pod względem zgłaszania SAE.

Potrzeba stworzenia systemów rejestracji dawców spokrewnionych jest powszechnie akceptowana. Umożliwi to lepszą ocenę ryzyka w tej grupie dawców. Jednak, poza kilkoma wyjątkami, rejestry takie, nawet te prowadzone na poziomie krajowym, nie są skuteczne. Mimo że wszystkie organizacje zajmujące się przeszczepianiem KKM podkreślają potrzebę prowadzenia takich systemów raportowania dla dawców spokrewnionych, to jednak w praktyce systemy te nie działają prawidłowo.

Istotnym problemem pozostaje wpływ pobierania KKM na organizm dawcy w dłuższej perspektywie. Niewiele jeszcze wiadomo o ryzyku odległego wpływu pobierania KKM z krwi obwodowej na zdrowie dawcy. Zagadnieniem szczególnej troski pozostaje możliwość wystąpienia u dawców nowotworów układu krwiotwórczego, guzów litych, zespołów mielodysplastycznych oraz chorób naczyniowych i z autoagresji. W retrospektywnym badaniu

*European Group of Blood and Marrow Transplantation* (EBMT), w którym analizowano kwestionariusz *follow-up*, w grupie 51 000 badanych dawców u 20 (w tym u 15 spokrewnionych) wykryto nowotwór układu krwiotwórczego w okresie 4 miesięcy — 12 lat od pobrania.

Obecnie duże rejestry dawców niespokrewnionych gromadzą prospektywnie usystematyzowane dane o odległych reakcjach niepożądanych u dawców KKM. *World Marrow Donor Association* proponuje co najmniej 10-letnią obserwację dawcy po pobraniu KKM. Unia Europejska rozważa wymóg zapewnienia dawcy spokrewnionemu oraz niespokrewnionemu dożywotniej obserwacji po pobraniu. Jednak taka długotrwała obserwacja dawców spokrewnionych, poza koniecznością pokonania przeszkód natury organizacyjnej przez ośrodki przeszczepiania, stwarza również problemy finansowe. Odległa obserwacja po podaniu czynnika wzrostu zdrowemu dawcy pozostaje zatem bardzo istotnym, wymagającym rozwiązania, zagadnieniem.

Brand i wsp. [6] stwierdzają, na podstawie również innych opracowań, że brakuje jeszcze danych pochodzących zarówno od bardzo młodych, jak i starszych dawców. Konieczność ujednoczenia nadzoru nad dawcami spokrewnionymi i niespokrewnionymi staje się coraz pilniejsza, ponieważ wraz z pojawianiem się nowych programów mobilizacji KKM, zwiększonym zapotrzebowaniem na drugie i kolejne pobrania KKM, coraz większym udziałem dawców pediatrycznych KKM z krwi obwodowej oraz postępowaniem w dziedzinie przeszczepiania komórek pojawiają się zupełnie nowe problemy natury medycznej i etycznej.

## Zaawansowana terapia komórkowa

Zapewnienie odpowiednich standardów dotyczących terapii komórkowej jest jednym z priorytetów współczesnego leczenia. *American Association of Blood Banks* (AABB) jako pierwsze wprowadziło standardy dotyczące szczególnych wymagań dotyczących przeszczepiania komórek krwiotwórczych, a w 2009 roku wspólnie z *International Society Blood Transfusion* (ISBT), utworzyło grupę roboczą zajmującą się terapią komórkową. Wyniki prac przedstawił Celluzzi i wsp. [9]. W ramach tej grupy roboczej utworzono sekcje zajmujące się tematyką: krwi pępowinowej, zastosowaniem klinicznym terapii komórkowej, zarządzaniem i kosztami terapii komórkowej, wytwarzaniem i badaniem produktów terapii komórkowej, zapewnieniem jakości, regulacjami prawnymi, nowymi zastosowaniami oraz rozwojem produktów terapii komórkowej.

W pracach poszczególnych sekcji obecnie czynnie uczestniczą przedstawiciele 24 państw z całego świata. Rozwija się współpraca pomiędzy różnymi organizacjami zajmującymi się terapią komórkową, wykorzystaniem, badaniem czynników chorobotwórczych, znakowaniem preparatów itp. Prowadzona jest działalność edukacyjna poprzez liczne wydawnictwa książkowe, publikacje w czasopiśmie *Transfusion*, organizowanie kursów i konferencji szkoleniowych. Dzięki wprowadzaniu nowych technologii obserwuje się stały rozwój terapii komórkowej. Jest to niezwykle obiecująca dziedzina współczesnej medycyny, która wymaga szerokiej współpracy w trosce o bezpieczeństwo zarówno dawców, jak i biorców.

Szeroko dyskutowane jest zastosowanie komórek embrionalnych w terapii komórkowej. Ograniczenia do ich stosowania mają charakter zarówno etyczny, jak i praktyczny, albowiem trudno jest uzyskać liczbę embrionów zapewniającą szeroki zakres haplotypów HLA pasujący do komórek pacjenta. Z tego względu coraz częściej wykorzystuje się techniki reprogramowania komórek somatycznych do komórek pluripotencjalnych. Jednym ze źródeł takich komórek somatycznych jest krew pępowinowa (KP) [10]. W chwili obecnej w ograniczonym zakresie stosuje się indukowane komórki pluripotencjalne, ponieważ, jeśli pochodzą one od pacjenta, zawierają wszystkie mutacje genetyczne nagromadzone w czasie jego życia. W odniesieniu do krwi pępowinowej takich ograniczeń nie ma. Zaprezentowano możliwości przekształcenia komórek CD133+ z KP w indukowane komórki typu embrionalnego (h-ES-like) za pomocą 4, 3 i 2 czynników transkrypcyjnych. Do badań wykorzystano jednostki KP przechowywane w stanie zamrożenia przez co najmniej 5 lat. Wszystkie uzyskane komórki różnicowały się prawidłowo do linii komórkowych wszystkich 3 listków zarodkowych. Uzyskano *in vitro* wyspecjalizowane komórki takie jak kardiomiocyty i komórki neuronalne. Analiza cytogenetyczna wykazała kariotyp 46XY oraz 46 SPAC XX, po więcej niż 10 pasażowaniach hodowli. Uzyskane wyniki wskazują na duże możliwości zastosowania komórek KP przechowywanych w stanie zamrożenia. Jednak zastosowanie tych komórek w praktyce klinicznej wymaga opracowania mechanizmów bezpieczeństwa zapewniających pełną kontrolę nad komórkami przeznaczonymi do przeszczepiania.

Równolegle prowadzone są prace nad wykorzystaniem ukierunkowanych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku, krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej w medycynie regeneracyjnej. Przedstawiono wstępne wyniki badań prowadzonych

w Portugalii nad wykorzystaniem komórek macierzystych ze szpiku do regeneracji mięśnia sercowego w następstwie zawału serca [11]. Od pacjentów pobierano 50–60 ml szpiku i izolowano w systemie zamkniętym komórki macierzyste w objętości końcowej 10–15 ml. Sześciu pacjentom (5 mężczyzn, 1 kobieta) podawano od 48 do  $126 \times 10^6$  komórek CD34+. Stwierdzono regenerację mięśnia sercowego. Nie obserwowano żadnych reakcji niepożądanych.

Krew pępowinowa jest doskonałym źródłem komórek macierzystych, ale ograniczeniem do jej stosowania jest liczba komórek zawartych w jednostce. Z tego względu od wielu lat opracowywane są standardowe metody zapewniające uzyskanie w procesie namnażania odpowiedniej liczby komórek dla dowolnego pacjenta [12]. Jako podłoże podczas ekspansji komórek z KP zastosowano komórki mezenchymalne. Wykorzystano cztery różne warunki hodowli: cytokiny, komórki mezenchymalne i cytokiny, cytokiny z chelatem miedzi oraz komórki mezenchymalne z cytokinami i chelatem miedzi. Hodowle prowadzono przez 14 dni. Uzyskano odpowiednio 6,5-krotny, 25-krotny, 7,9-krotny i 31,6-krotny wzrost liczby komórek.

Jednym z istotnych elementów terapii komórkowej jest stworzenie odpowiednich warunków do długoterminowego przechowywania preparatów krwi pępowinowej. Istotne znaczenie ma zarówno odpowiednie izolowanie frakcji komórek CD34+ prowadzące do znaczącego zmniejszenia objętości przechowywanych preparatów, jak i zapewnienie odpowiednich warunków zamrażania wyizolowanych frakcji.

Przedstawiono wyniki pracy, w której do izolacji komórek CD34+ wykorzystano system zamknięty Sepax [13]. Pobrane preparaty KP podzielono na trzy grupy w zależności od ich objętości: 1. objętość pobranej krwi poniżej 100 ml, 2. objętość 100–150 ml i 3. objętość powyżej 150 ml, i uzyskane wyniki poddano analizie. W grupie drugiej odzyskanie komórek jądrzastych (TNC, *total nuclear cell*) było najwyższe. Odzyskanie TNC wyniosło średnio  $81,6\% \pm 8,5\%$ , a komórek CD34+  $87,2\% \pm 10,9\%$ .

Antoniewicz-Papis i wsp. przedstawili wyniki porównania metody kontrolowanego zamrażania krwi pępowinowej z metodą zamrażania dwuetapowego [14]. Nie zaobserwowano statystycznie znaczących różnic między obydwoma metodami w zakresie odzyskania komórek jądrzastych, komórek CD34+ oraz ich żywotności. Ze względu na konieczność spełnienia wymogów dobrej praktyki wytwarzania i standaryzacji metody, wskazane jest stosowanie metody kontrolowanego zamrażania, która zapewnia powtarzalność warunków każdej

procedury zamrażania. W wyjątkowych przypadkach można stosować metodę dwuetapową. Zbadano także wpływ procedury zamrażania na komórki izolowane za pomocą różnych metod: z wykorzystaniem Plasmasterilu, hydroksyetylowanej skrobi, żelatyny, kożuszka leukocytarno-płytkowego i filtrów do usuwania leukocytów z krwi pępowinowej (TF-4). Wyniki pracy wykazują, że parametry jakości zamrożonej krwi pępowinowej nie zależą od metody izolowania komórek macierzystych.

Prace z zakresu terapii komórkowej poświęcone były analizie wyników klinicznych oraz prac doświadczalnych. Ogółem zaprezentowano ponad 50 prac dotyczących terapii komórkowej i przeszczepiania.

### **Piśmiennictwo**

- Rodrigues A., Garcao A., Moreno R i wsp. Plerixafor (AMD 3100) usefully in poor mobilizers patients. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 333, P-636 .
- Rodrigues A., Garcao A., Moreno R. i wsp. Plerixafor usefully in “novo” (first) mobilization. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 333, P-637 .
- Grubovikij R., Schiller G. Collection and transplantation of autologous peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 341, P-660.
- Balint B., Stomatovic D., Todorovic M., Elez M. The use of autologous transplant in aplastic anemia: correlation of CD34+/CD90+ cells applied and clinical outcome. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 340, P-655.
- Juncal C., Rodrigues A., Garcao A., D’Avo M., Lacerda J.F., Mendes L. Haploidentical peripheral blood stem cell (PBSC) in adult transplantation (Tx) with Clinimacs system; Hospital Santamaria (HSM) experience. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 341, P-658
- Brand A. and the ISBT/AABB Joint Working Party on Cellular Therapy. Uniform examination of stem cell donors. *ISBT Science Series* 2011; 6: 160–164 .
- Brand A., Perez I.H. Uniform examination of stem cell donors. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, 3D-S11-02.
- Niederwieser D., Gentilini C., Hegenbart U. i wsp. Transmission of donor illness by stem cell transplantation: should screening be different in older donors? *Bone Marrow Transplant.* 2004; 34: 657–665.
- Celluzzi C.M., Lopez K., McKenna D., McMannis J.D. AABB cellular therapy initiatives. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, 3D-S11.
- Gorgetti A., Fazzina R., Li M., Belmonte C.I. Human cord blood reprogrammed into embryonic-like stem cells. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, 3B-PL2.
- Gomes M.G., Raposo L., Alves M. i wsp. Autologous bone marrow mononuclear cell transfer after acute myocardial infarction and in chronic ischaemic cardiomyopathy — initial experience in Portugese center. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, 3A-S02.
- Nasiri N., Amirizadeh N., Zaker F. Cord blood hematopoietic stem cells expansion in co-culture with mesenchymal stem cells and copper chelator. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, P-628.
- Nikoogofar Zarif M. Cord blood total nucleated and CD34+ cell recovery after volume reduction using Sepax automated system. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, P-627.
- Antoniewicz-Papis J., Lachert E., Woźniak J., Janik K., Tomaszewska A., Łętowska M. Methods of cryopreservation of cord blood hematopoietic stem cells. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 39, P-625.