

Terapia komórkowa ze szczególnym uwzględnieniem mobilizacji i pobierania komórek macierzystych do przeszczepienia

Jolanta Antoniewicz-Papis¹, Ryszard Pogłód¹, Elżbieta Lachert²

¹Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

²Zakład Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Terapia komórkowa budzi coraz większe zainteresowanie wśród naukowców. Dlatego *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) powołało w 2010 roku grupę roboczą zajmującą się tą tematyką (*ISBT/AABB Working Party on Cellular Therapy*). W czasie XXXI Międzynarodowego Kongresu ISBT w Berlinie poświęcono temu zagadnieniu wiele uwagi. Omówiono zasady działania banków komórek, jednostek zajmujących się pobieraniem, badaniem, preparatyką i przechowywaniem komórek macierzystych oraz standardy obowiązujące w bankach tkanek. Ponieważ jednostki służby krwi w wielu krajach są zaangażowane w działania związane z krwiotwórczymi komórkami macierzystymi, najwięcej uwagi poświęcono tym właśnie komórkom.

Dziewięć sesji Kongresu poświęcono terapii komórkowej. Dotyczyły one pobierania komórek macierzystych, medycyny regeneracyjnej, immunoterapii komórkowej, terapii genowej, preparatyki komórek macierzystych, bankowania komórek i tkanek z uwzględnieniem krwi pępowinowej.

Doktor Schlenke z Uniwersytetu w Münster (Niemcy) przedstawił obecny stan wiedzy oraz wymagania obowiązujące banki komórek, zgodne z Dyrektywą 2004/23/WE. Zaznaczył, że banki komórek muszą stosować się do zasad dobrej praktyki wytwarzania (GMP, *good manufacturing practice*) [1]. Pobieranie komórek macierzystych z krwi obwodowej (PBSC, *peripheral blood stem cells*) nie jest zabiegiem technicznie trudnym do przeprowadzenia i obarczone jest minimalnym ryzykiem dla dawcy, natomiast zabieg pobierania komórek ze szpiku

(BM, *bone marrow*) wiąże się z większym ryzykiem, związanym przede wszystkim z ogólnym znieczuleniem dawcy. W celu uzyskania odpowiedniej frakcji komórek pobrane preparaty mogą być poddawane dodatkowym czynnościom z zachowaniem zasad GMP.

W wyniku wielu badań klinicznych stwierdzono różnice w średniej zawartości komórek w materiale przeznaczonym do przeszczepienia w zależności od źródła ich uzyskania — i tak zawartość komórek CD34+ wynosiła średnio $7 \times 10^6/\text{kg}$ mc. w PBSC i $2,8 \times 10^6$ w szpiku, komórek jądrzastych odpowiednio 900×10^6 i 200×10^6 , a limfocytów T — 270×10^6 i 22×10^6 .

Pobrane komórki można przechowywać w stanie płynnym do 48 godz. od pobrania. Materiał przeznaczony do późniejszego wykorzystania jest zamrażany ze środkiem kriochronnym DMSO (dime-tylosulfotlenek) z zachowaniem zasad GMP.

Jako optymalne do przechowywania przyjmuje się zazwyczaj końcowe stężenie co najmniej $1 \times 10^8/\text{ml}$ komórek w preparacie. W swoim ośrodku Schlenke przyjmuje wartość do $4 \times 10^8/\text{ml}$ komórek. Twierdzi, że bardziej krytyczne dla jakości komórek i ich żywotności jest odpowiednie przeprowadzenie procesu zamrażania niż końcowe stężenie komórek. Zgodnie z zasadami GMP sprzęt do zamrażania i samą procedurę należy poddawać starannej walidacji. Komórki macierzyste w stanie zamrożenia można przechowywać wiele lat, co stanowi między innymi uzasadnienie dla organizowania banków krwi pępowinowej.

Adres do korespondencji: dr n. farm. Jolanta Antoniewicz-Papis, IHiT, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel.: (22) 34 96 381, faks: (22) 34 96 376, e-mail: jpapis@ihit.waw.pl

Pobraną materiał można wykorzystywać również do wykonania pewnych czynności *in vitro*, na przykład farmakologicznego lub immunologicznego usuwania komórek nowotworowych. Dotychczas nie przedstawiono zbiorczych wyników podejmowanych w tym zakresie prób, a otrzymane rezultaty nie zostały potwierdzone w randomizowanych badaniach klinicznych. W chwili obecnej za dobrze opracowaną procedurę, zgodnie z GMP, uznaje się usuwanie limfocytów T i B w celu zapobiegania poprzyszczepowej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft versus host disease*) i chorobom limfoproliferacyjnym związanym z występowaniem wirusa Epsteina-Barr.

Schlenke zwraca uwagę, że przeszczepianie komórek macierzystych jest raczej „dopasowanym” fragmentem leczenia niż stosowaniem zgodnego ze standardami, gotowego do użycia leku i że nowe techniki wychodzące poza ramy GMP mogą czasami okazać się korzystne dla pacjenta.

Humpe i wsp. szeroko omówili warunki, jakie muszą zostać spełnione, aby preparat komórek macierzystych został dopuszczony do zabiegu przeszczepienia [2]. Pobieranie, wytwarzanie, przechowywanie i zwalnianie produktów komórkowych jest regulowane przez światowe przepisy i wytyczne w tym zakresie, czyli Dyrektywę 2004/23/WE, 2006/17/WE, normy *Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy-Joint Accreditation Committee* — ISCT & EBMT (FACT-JACIE), przepisy *Food and Drug Administration* (FDA), na podstawie których każdy kraj opracowuje kryteria zwalniania różnych produktów komórkowych. Ścisłe określona powinna być także specyfikacja produktu z uwzględnieniem zastosowania autologicznego i allogenicznego.

Zwolnienie produktu muszą poprzedzać dokładne badania dawcy/pacjenta, od którego pobierany będzie materiał komórkowy. Oprócz wywiadu medycznego niezwykle istotne jest wykonanie badań laboratoryjnych w kierunku obecności czynników zakaźnych. Podstawowy zakres tych badań to kontrola HCV, HBV, HIV1/2 oraz kiły. W przypadku dawców autologicznych możliwe jest zakwalifikowanie dawcy z dodatnimi wynikami badań. Humpe podkreśla, że procedura pobierania i preparatyki materiału przeznaczonego do przeszczepienia musi się odbywać przy użyciu poddanego kwalifikacji (walidacji) sprzętu, a procesy powinny być zwalidowane. Zarówno sprzęt, jak i procedury muszą być dobrze udokumentowane w Standardowych Procedurach Operacyjnych (SOP, *standard operating procedures*) i zgodne z zasadami GMP.

Na każdym etapie procesu oraz po jego zakończeniu niezbędne jest prowadzenie kontroli jakości

za pomocą zwalidowanych metod. Materiał musi spełniać wstępnie ustalone specyfikacje obejmujące między innymi liczbę komórek CD34+/kg mc. biorcy. Obecnie zaleca się dla przeszczepów autologicznych minimalną dawkę 2×10^6 /kg, a dla allogenicznych 4×10^6 /kg mc. komórek CD34+. Ponadto niezbędnym parametrem kontroli jakości jest ocena żywotności pobranych komórek. Niezwykle istotna jest także ocena potencjalnego zanieczyszczenia drobnoustrojami. W przypadku przeszczepów allogenicznych należy określić liczbę komórek T CD3 dodatnich, natomiast w przypadku przeszczepów autologicznych niezbędna jest ocena zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi. Pobrane komórki, poddawane na przykład hodowli czy aktywacji, wymagają dodatkowych badań kontroli jakości, które wykażą, czy komórki nie uległy między innymi podczas tych działań zakażeniu czynnikami chorobotwórczymi, nie została zaburzona ich funkcjonalność, nie spowodowało to zmian genetycznych czy nowotworowych.

Humpe podkreśla, że wymagania dotyczące jakości muszą być bardzo wyraźnie sprecyzowane przed zwolnieniem produktów komórkowych do leczenia. Muszą one uwzględniać potencjalną korzyść wynikającą z zastosowania tych preparatów u pacjenta. Nie powinny być zwalniane preparaty, które nie spełniają wymogów wcześniej ustalonej specyfikacji, chociaż może się zdarzyć, że potencjalna korzyść z zastosowania preparatów niespełniających norm przeważa potencjalne ryzyko ich użycia. Jednak takie przypadki powinny być bardzo mocno uzasadnione i wyraźnie udokumentowane.

Preparaty komórek macierzystych przeznaczone do przeszczepienia muszą spełniać określone wymagania. Oprócz liczby komórek CD34+ i ich żywotności, istotny jest między innymi brak czynników chorobotwórczych w pobranym materiale.

Richter i wsp. przedstawili badania, podczas których stwierdzili, że obecność DMSO w preparacie nie przeszkadza w oznaczeniu sterylności preparatu komórek macierzystych [3]. Poddawali oni hodowli próbki o objętości 1 ml komórek macierzystych w 10% DMSO za pomocą analizatora BacT-Alert. Porównywali próbki, do których dodano bakterie *Haemophilus influenza* (szczep ATCC10211) w liczbie 10–100 jednostek tworzących kolonie bakteryjne/ml, z próbkami kontrolnymi. Wszystkie próbki, do których dodano bakterie, wykazały ich wzrost po 1–3 dniach inkubacji, natomiast próbki bez bakterii nie wykazały wzrostu. Wyniki tych badań są bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego zastosowania komórek, gdyż wskazują na możliwość oznaczenia zakażenia bakteryjnego w końcowym prepara-

cie przeznaczonym do przeszczepienia, zawierającym DMSO, z wykorzystaniem próbki o niewielkiej objętości, której pobranie nie wpływa znacząco na końcową liczbę komórek w preparacie.

Oddzielny wykład Pruss i wsp. poświęcili obecnemu stanowi wiedzy i uregulowaniom prawnym obowiązującym w bankach tkanek, które swoją działalnością nie są tak silnie związane z jednostkami służby krwi. Dla nich również podstawowymi przepisami regulującymi działalność są Dyrektywy 2004/23/WE oraz 2006/17/WE i 2006/86/WE, które regulują między innymi kryteria kwalifikacji dawców, zakres niezbędnych badań oraz system jakości obowiązujący w bankach tkanek [4].

W sesji poświęconej preparatyce komórek macierzystych Nikougoftar Zarif i wsp. przedstawili wpływ regulacji różnicowania komórek CD133+ do megakariocytów za pomocą mikroRNA-10a [5]. Wyizolowane komórki poddawano hodowli w obecności koktajlu cytokin (SCF, TPO i Flt3l), a następnie transfekcji miR-10a z jednoczesnym dodatkiem TPO (kontrola dodatnia) i bez cytokin (kontrola ujemna). Różnicowanie komórek oceniano metodą cytometrii przepływowej. Uzyskano $7,2 \pm 3,2\%$ komórek CD41+ w grupie niepoddawanej transfekcji oraz $31,1 \pm 9,8\%$ w komórkach transfekowanych. W kontroli dodatniej wartość ta wynosiła $86,6 \pm 7,4\%$. Komórki tworzyły kolonie po 2 tygodniach hodowli w Megacult (MegaCult® STEM Technologies; podłoże do hodowli progenitorów megakariocytów). Otrzymane wyniki wskazują, że regulacja za pomocą miR-10a może wpływać na różnicowanie komórek CD133+ w kierunku megakariocytów z utrzymaniem ich zdolności klonogennych. Wydaje się, że regulacja poprzez miR-10a wpływa na wzrost ekspresji HOXA1 i różnicowanie megakariocytów, co może mieć znaczenie kliniczne w przyszłości.

Müller-Steinhardt i wsp. ocenili wpływ długoterminowego przechowywania krwi pępowinowej (KP) na jej zdolności klonogenne [6]. Badano 34 jednostki KP uprzednio poddane zmniejszeniu objętości i przechowywane przez 103–145 miesięcy w parach azotu. We wszystkich preparatach KP liczba komórek jądrzastych wynosiła powyżej 5×10^8 , a końcowe stężenie DMSO jako środka kriochronnego wynosiło 5%. Odzyskanie komórek jądrzastych po rozmrożeniu wynosiło średnio $38,7 \pm 12,2\%$, podczas gdy dla komórek CD34+ — $92,5 \pm 53,5\%$, w zakresie 22,8–213,0%. Nie stwierdzono znaczących różnic w odzyskaniu komórek jądrzastych i kolonii CFU-GM (*colony forming units-granulocyte macrophage*) w jednostkach przechowywanych krócej niż 105 miesięcy w porównaniu z jednostkami przechowywanymi 134–145 miesię-

cy. Dla komórek jądrzastych uzyskano odpowiednio $32,9 \pm 9,9\%$ oraz $44,9 \pm 13,4\%$, a dla CFU-GM $5,4 \pm 2,6 \times 10^5$ i $8,4 \pm 6,2 \times 10^5$.

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że możliwość tworzenia kolonii CFU-GM zostaje zachowana podczas 145-miesięcznego okresu przechowywania, co stanowi istotne uzasadnienie dla bankowania KP. Stwierdzono straty w średniej liczbie odzyskanych komórek, jednakże rozrzut uzyskanych wyników był znaczny. Stwierdzono ponadto, że długotrwałe przechowywanie allogenicznego KP jest możliwe, ponieważ nie zaobserwowano zależności pomiędzy liczbą odzyskanych komórek a żywotnością w stosunku do czasu ich przechowywania.

Wiele prezentacji i plakatów poświęcono badaniom komórek mezenchymalnych (MSC, *mesenchymal stem cells*). Rebulla i Giordano zaprezentowali obecne regulacje prawne dotyczące zastosowania klinicznego MSC, które podlegają przepisom dotyczącym zaawansowanej terapii produktów medycznych (ATMP, *Advanced Therapy Medicinal Products*) European Regulation No. 1394/2007 [7]. Regulacja ta obejmuje także terapię genową, terapię komórkami somatycznymi i inżynierię komórkową. Dlatego podczas prac nad MSC należy stosować się do wymagań cGTP (*current good tissue practice*) oraz GMP. Wszystkie procedury oraz wykorzystywany sprzęt należy poddawać walidacji i stałej kontroli. Stosowane obecnie metody ekspansji MSC wymagają pożywek przygotowanych z materiału pochodzenia zwierzęcego, takich jak na przykład płodowa surowica cielęca (FCS, *fetal calf serum*), z czym wiąże się ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych; ponadto ze względu na zmienność między poszczególnymi seriami tego odczynnika należy liczyć się z niekorzystnym wpływem na wydajność hodowli. Z tego względu zamiast FCS coraz częściej proponuje się wykorzystanie ludzkiej surowicy lub osocza oraz czynników wzrostu.

Rojewski i wsp. przedstawili wyniki pracy, której celem było wystandaryzowanie protokołu zgodnego z wymaganiami GMP, dotyczącego ekspansji MSC bez składników pochodzenia zwierzęcego [8]. Hodowli poddawano komórki uzyskane ze szpiku pobranego do próbek z heparyną. Szpik wraz z lizatem krwinek płytkowych inkubowano w standardowych warunkach hodowlanych. Po 2–4 dniach komórki przemywano PBS (*phosphate buffered saline*) i kontynuowano hodowlę. Po 12–17 dniach rozpoczynano hodowlę CFU-F (*colony forming units-fibroblast*). Standaryzowano również procedurę otrzymywania lizatu z koncentratu krwinek płytkowych w roztworze wzbogacającym. Pobierano 27–54 ml szpiku o średniej zawartości MNC $1,0 \times 10^7$

MNC/ml BM, co odpowiadało $0,53 \pm 0,32$ CFU-F/cm². Uwzględniając obliczenie dla pełnego ładunku inkubatora po ekspansji, uzyskiwano od $1,6 \times 10^7$ do $1,1 \times 10^9$ MSC/pobranie BM. Średnia liczba CFU-F/10⁶ MNC wynosiła 53. Niezależnie od różnic w objętości pobieranego BM, liczby MNC/ml BM i różnic liczby CFU-F/10⁶ MNC, liczba podwojonej populacji i czas niezbędny do podwojenia były podobne. Komórki mezenchymalne po ekspansji poddawano kontroli uwzględniającej: różnicowanie w kierunku osteoblastów, chondroblastów i komórek tłuszczowych, testy mikrobiologiczne, testy wirusologiczne, badanie endotoksyn i grzybów. Autorzy przedstawili wystandaryzowany, zgodny z GMP system ekspansji *ex vivo* komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku, w którym nie użyto żadnych odczynników pochodzenia zwierzęcego. Uzyskane dane wykazywały heterogenność odpowiadającą heterogenności materiału wyjściowego. Doświadczenia te stanowią wstęp do dalszych badań, które mogą zapewnić uzyskanie klinicznej dawki MSC dla dorosłego pacjenta podczas jednoetapowej, dwutygodniowej procedury.

Xia i wsp. przedstawili pracę, której celem było porównanie ekspansji MSC, otrzymanych z BM, w obecności FCS oraz lizatu ludzkich krwinek płytkowych [9]. Porównywano hodowle z dodatkiem 10% FCS oraz 7,5% lizatu płytkowego. Wysiewano MSC w ilości 1000 komórek/cm². Metodą cytometrii przepływowej oznaczono markery komórkowe CD34, CD45, CD80, CD86, CD105, CD166 i P5. Ocenie poddano różnicowanie komórek za pomocą standardowych metod barwienia. Nie stwierdzono znaczących różnic w stopniu ekspansji w zależności od rodzaju hodowli. Lizat krwinek płytkowych zapewnia takie same warunki podczas ekspansji MSC do użytku klinicznego, jak media pochodzenia zwierzęcego, a jednocześnie eliminuje źródło ksenogenicznych antygenów i zapobiega przeniesieniu czynników zakaźnych pochodzenia zwierzęcego.

Podobny cel postawili sobie Peterbauer-Scherb i wsp., z tym że hodowli poddawali komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej. Stwierdzili nawet większy potencjał proliferacyjny tych komórek przy zastosowaniu lizatu krwinek płytkowych niż FCS [10].

Prezentacje ustne i plakatowe skupiały się także na zagadnieniach: optymalizacji mobilizacji komórek macierzystych z zastosowaniem antagonisty receptora chemokin (Mozobil, Genzyme), bezpieczeństwa stosowania czynników wzrostu u zdrowych dawców oraz różnic efektywności mobilizacji komórek u dawców spokrewnionych i niespokrewnionych.

Leitner i wsp. omówili zagadnienie bezpieczeństwa podawania czynników wzrostu u zdrowych dawców komórek macierzystych do przeszczepienia allogenicznego [11]. Rola rekombinowanego ludzkiego czynnika wzrostu kolonii granulocytów w ewentualnej indukcji procesu karcinogenezy u zdrowych dawców komórek macierzystych nadal pozostaje niejasna. Inspiracją prezentowanej przez Leitnera pracy były wyniki badań Naglera i wsp. z 2004, które wykazały zmiany genetyczne i epigenetyczne w limfocytach dawców otrzymujących rhG-CSF (*recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*). Owe zmiany były podobne do tych stwierdzanych u chorych na nowotwory złośliwe. Autorzy przeprowadzili prospektywne badanie metylacji DNA oraz aktywności metylotransferazy DNA (DNMT, *deoxyribonucleic acid methyltransferase*) w ekstraktach jąder komórkowych limfocytów u 20 dawców otrzymujących rhG-CSF (badanie przy użyciu cytometrii przepływowej i badania radioizotopowe). Grupę kontrolną stanowiło 20 krwiodawców nieotrzymujących czynnika wzrostu. Aktywność DNMT oznaczano przed podaniem G-CSF oraz w różnych punktach czasowych w ciągu jednego roku od rozpoczęcia podawania czynnika wzrostu. Wynik badania nie wykazał indukcji aktywności DNMT ani zwiększonej metylacji DNA po zastosowaniu rhG-CSF u zdrowych dawców komórek macierzystych.

Hölig i wsp. analizowali czynniki ryzyka niepowodzenia mobilizacji u zdrowych dawców i zastanawiali się, czy ryzyko to jest większe u dawców spokrewnionych z biorcą [12]. Stwierdzili, że przeszczepienie PBSC wykonuje się u coraz starszych pacjentów, a dawców komórek macierzystych poszukuje się najpierw wśród osób spokrewnionych, zakładając, że charakteryzuje je korzystniejszy profil ryzyka w stosunku do dawców niespokrewnionych. Autorzy ocenili donacje komórek macierzystych przeprowadzone w ich klinice w okresie 20 miesięcy u 465 zdrowych dawców spokrewnionych z biorcą (w badanej grupie występowała niewielka przewaga mężczyzn — 264) i porównali je z donacjami grupy kontrolnej (2775 zdrowych niespokrewnionych dawców). Do mobilizacji komórek macierzystych stosowano lenograstim 7,5 µg/kg przez 5–6 kolejnych dni. Leukaferezę wykonywano w 5. i 6. dniu (przy 4–5-krotnym przepływie całej objętości krwi) w separatorze z ciągłym przepływem (*Cobe Spectra, Caridian BCT*). Średnia liczba komórek CD34+ w krwi obwodowej przed separacją w 5. dniu wyniosła 51/µl u dawców spokrewnionych, a 62/µl u dawców niespokrewnionych. Stwierdzono, że liczba uzyskanych po separacji ko-

mórek CD34+ u dawców spokrewnionych wyniosła $6,1 \times 10^6/\text{kg mc.}$ biorcy i $8,2 \times 10^6/\text{kg mc.}$ biorcy u dawców niespokrewnionych (różnica istotna statystycznie). Wykonanie drugiego zabiegu leukaferozy było konieczne u 20% dawców niespokrewnionych i u 30% dawców spokrewnionych (różnica statystycznie znamienne). Działania niepożądane po podaniu lenograstimu (ból kostny, ból głowy) zgłosiło więcej dawców niespokrewnionych niż spokrewnionych. Parestezje w trakcie separacji zgłosiło również więcej dawców niespokrewnionych. Autorzy wnioskują, że stosowana dawka lenograstimu skutecznie mobilizowała komórki macierzyste u większości dawców spokrewnionych. Jednak zarówno liczba komórek macierzystych we krwi obwodowej dawców, jak i uzyskana liczba komórek macierzystych były znacząco mniejsze u dawców spokrewnionych. Autorzy stwierdzają, że przyczyną różnicy w skuteczności mobilizacji jest znaczna różnica wieku między dawcami spokrewnionymi i niespokrewnionymi (mediana odpowiednio: 48 i 33 lata). Należy zatem zawsze brać pod uwagę ryzyko gorszej mobilizacji wśród dawców spokrewnionych z biorcą, ponieważ są oni zwykle znacznie starsi od dawców niespokrewnionych.

Worel i wsp. analizowali zagadnienie optymalizacji programu mobilizacji macierzystych komórek krwiotwórczych przy użyciu G-CSF i Plerixaforu u chorych, którzy wcześniej nie odpowiedzieli na konwencjonalne programy mobilizacyjne [13]. Stwierdzili, że niepowodzenie uzyskania docelowej dawki $2 \times 10^6/\text{kg mc.}$ komórek CD34+ stanowi istotny problem dla wielu ośrodków przeszczepiania. Plerixafor, antagonistą receptora chemokin, w połączeniu z G-CSF okazał się skuteczniejszy niż G-CSF z placebo. Autorzy zastosowali Plerixafor do mobilizacji komórek macierzystych u 30 chorych (szpiczak plazmocytowy — 8, chłoniak nieziarniczny — 19, rak z komórek zarodkowych — 3), u których nie powiodły się wcześniejsze próby mobilizacji. Chorzy ci otrzymali uprzednio średnio 8 cykli chemioterapii. Podawano G-CSF $10 \mu\text{g}/\text{kg mc.}$ przez 4 dni, a następnie na 10–11 godz. przed pierwszą aferezą, Plerixafor- $240 \mu\text{g}$; G-CSF + Plerixafor stosowano codziennie, aż do zebrania ponad 2×10^6 komórek CD34+/ kg mc. biorcy. Po 5. dniu od pierwszego podania Plerixaforu średnia liczba komórek CD34+ we krwi obwodowej wyniosła $24/\mu\text{l}$ (5–61), a u 21/30 (70%) chorych uzyskana liczba komórek macierzystych była wystarczająca do przeszczepienia (wyniosła średnio $4,15 \times 10^6/\text{kg mc.}$) Objawy uboczne (ze strony przewodu pokarmowego i parestezje) były łagodne. Autorzy wnioskują, że Plerixafor jest wysoce skutecznym i dobrze to-

lerowanym środkiem do mobilizacji komórek macierzystych u chorych po uprzednim niepowodzeniu mobilizacji.

We wstępie swej drugiej pracy dotyczącej Plerixaforu Worel podaje, że mobilizacja krwiotwórczych komórek macierzystych z następowym autologicznym przeszczepieniem pozostaje najbardziej skutecznym leczeniem wielu chorych ze szpiczakiem plazmocytowym, chłoniakiem Hodgkina i chłoniakami nieziarnicznymi [14]. Jednak u znacznej liczby tych chorych nie udaje się uzyskać odpowiedniej liczby komórek CD34+ ($> 2 \times 10^6/\text{kg mc.}$) przy zastosowaniu konwencjonalnych programów mobilizacji (tj. chemioterapia z G-CSF lub tylko G-CSF). Celem prezentowanego badania była optymalizacja metod mobilizacji komórek u chorych, którzy otrzymali już wiele linii chemioterapii właściwych dla ich choroby, w tym DHAP (*dexamethasone, cisplatinum, cytosine arabinoside*), ICE (*ifosfamide, carboplatin, etoposide*), cyklofosamid i inne, u których poprzednie próby mobilizacji zakończyły się niepowodzeniem. Autor podawał G-CSF w połączeniu z Plerixaforem 13 chorym na chłoniaki nieziarnicze i szpiczaka plazmocytoowego (śr. wieku 56 lat, M — 7, K — 6). Plerixaforu nie podawano w sposób zaprogramowany. Na początku chorzy po chemioterapii otrzymywali G-CSF; jeśli po podaniu G-CSF liczba komórek CD34+ we krwi obwodowej była mniejsza niż 15 komórek/ $1\mu\text{l}$, wówczas włączano Plerixafor w dawce $240 \mu\text{g}/\text{kg mc.}$ przez kolejne dni, średnio 2 wstrzykiwania (1–3). Jednocześnie kontynuowano G-CSF, podając go 10–11 godz. przed planowanym zabiegiem leukaferozy. Po podaniu Plerixaforu autorzy obserwowali średnio 6,2-krotny (1,7–44) wzrost liczby komórek CD34+ w porównaniu z ich wyjściową liczbą. U wszystkich pacjentów uzyskano odpowiednią liczbę komórek CD34+ ($> 2 \times 10^6/\text{kg mc.}$). Objawy niepożądane wystąpiły w stopniu łagodnym do umiarkowanego i najczęściej dotyczyły przewodu pokarmowego (biegunka, wymioty, bóle brzucha). U 5 z tych 13 chorych wykonano już przeszczepienie zebranych po zastosowaniu Plerixaforu komórek macierzystych, uzyskując szybki i trwały efekt ($\text{ANC} > 0,5 \times 10^9/\text{l}$ w dniach 11–13 i liczba płytek $2 \times 10^9/\text{l}$ między dniem 11–17). Autorzy wnioskują, że dodanie Plerixaforu do G-CSF, po chemioterapii właściwej dla danej choroby, jest bezpieczne i pozwala uratować intensywnie leczonych chorych, u których nie powiodła się mobilizacja komórek macierzystych w konwencjonalnym programie leczenia.

Schrezenmeier i wsp. przeprowadzili analizę retrospektywną wpływu źródła komórek macierzystych w przypadku przeszczepów komórek macie-

rzystych od dawców spokrewnionych HLA-identycznych i zgodnych niespokrewnionych oraz analizę efektów leczenia pacjentów z nieznośnymi chorobami przy użyciu komórek pochodzących od zgodnych niespokrewnionych dawców w porównaniu z komórkami pochodzącymi od dawców spokrewnionych [15]. Badaniem objęto 455 allogenicznych przeszczepów w nabytych i wrodzonych zespołach niewydolności szpiku (BMF, *bone marrow failure*), 94 przeszczepy w przypadku hemoglobinopatii i 261 przypadków niedoborów odporności lub innych wrodzonych zaburzeń. Rzadziej przeszczepiano komórki macierzyste z krwi obwodowej u chorych z BMF (53%), hemoglobinopatiami (33%) i niedoborami odporności lub innymi wrodzonymi zaburzeniami (46%) w porównaniu z grupą chorych z ostrą białaczką szpikową (AML, *acute myeloid leukemia*)/ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) (87%/74%). Spokrewnieni HLA-identyczni dawcy stanowili 46% dawców dla chorych z BMF, 52% dla chorych z hemoglobinopatiami i 20% dla chorych z niedoborami, w porównaniu do 36%/29% w przypadku chorych z AML/ALL.

Wpływ źródła pochodzenia komórek i typu dawcy badano, porównując wyniki przeszczepienia u chorych z nabytą niedokrwistością aplastyczną (182 przeszczepy od dawców spokrewnionych i 114 przeszczepów od zgodnych niespokrewnionych dawców). Czas pomiędzy rozpoznaniem a przeszczepieniem wynosił odpowiednio od 98,5 dnia do 515,5 dnia (wykazano znamienność statystyczną), wiek pacjentów od 28,5 do 30 lat (nie wykazano znamienności statystycznej), 5-letnie prawdopodobieństwo przeżycia od 84,6% do 70,1% (wykazano znamienność statystyczną).

Przeżycie po przeszczepieniach od dawców spokrewnionych z wykorzystaniem BM jako źródła komórek było znacząco wyższe w stosunku do PBSC (95,3% *v.* 74,1%), a występowanie przewlekłego GvHD było znacząco wyższe w przypadku PBSC niż BM (47,0% *v.* 18,4%). Nie zaobserwowano natomiast różnic w stopniu nasilenia GvHD II-IV w zależności od źródła komórek. Źródło komórek nie miało również wpływu na przeżycie i wystąpienie ostrej lub przewlekłej GvHD po przeszczepieniach od zgodnego niespokrewnionego dawcy.

W podsumowaniu można stwierdzić, że przeszczepianie szpiku jest bardziej wskazane niż przeszczepianie PBSC w przypadku dawców spokrewnionych HLA-identycznych w nabytej niedokrwistości aplastycznej. Natomiast nie zaobserwowano ujemnego wpływu źródła komórek w przypadku przeszczepiania komórek od dawców zgodnych niespokrewnionych w tej grupie chorych. Wpływ rodzaju

dawcy i źródła komórek powinien być analizowany w każdym indywidualnym przypadku.

Zawartość komórek w materiale przeznaczonym do przeszczepienia jest podstawową informacją świadczącą o jakości tego materiału. Kreissig i wsp. przedstawili pracę, w której ocenili możliwości przewidywania zawartości komórek CD34+ w pobieranych preparatach [16]. Poddali oni badaniom retrospektywnym 676 zdrowych dawców komórek, którzy otrzymywali 12 µg lenograstimu na kg mc. dziennie przez 4 dni. Poszukiwali korelacji pomiędzy liczbą komórek CD34+ a: płcią, wiekiem, wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) i ubocznymi efektami stosowania G-CSF oraz pomiędzy zawartością CD34+ w preparatach otrzymanych metodą aferezy a stosunkiem masy ciała dawca–biorca. Stwierdzili zależność pomiędzy liczbą komórek CD34+ w krwi obwodowej a płcią i BMI u kobiet i mężczyzn. Wiek i występowanie efektów ubocznych nie były związane z wydajnością mobilizacji. Nie zaobserwowano również zależności pomiędzy zawartością komórek CD34+ w preparacie uzyskanym metodą aferezy a stosunkiem masy dawca–biorca. Większa masa ciała dawcy w stosunku do pacjenta nie gwarantuje wystarczającej liczby komórek w preparacie otrzymanym drogą aferezy. Zazwyczaj uważa się, że idealny dawca to młody mężczyzna o BMI 20–25. Kreissig tylko częściowo potwierdza te kryteria. Płeć męska i BMI powyżej 25 koreluje z lepszym wynikiem mobilizacji G-CSF.

Prawidłowe oznaczenie liczby komórek CD34+ jest jednym z krytycznych parametrów, dotyczących jakości przeszczepianego materiału i możliwości jego zastosowania. Farmakopea Europejska opisuje stosowanie „jednoplatfomowego” oznaczania (SPM, *single-platform method*) zawartości komórek CD34+ w preparatach komórek macierzystych.

Wagner i wsp. przeprowadzili walidację metody SPM zalecanej przez Farmakopeę i własnej metody „dwuplatfomowej” (DPM, *dual-platform method*). Badanie to było wstępem do walidacji opartej na wynikach badań klinicznych, dających najlepszą odpowiedź na pytanie dotyczące jakości zastosowanego materiału [17]. Szesnaście preparatów PBSC otrzymanych metodą aferezy poddano analizie zarówno SPM, jak i DPM, stosując analizator hematologiczny i cytometr przepływowy. W obydwu metodach nie stosowano procedury przemywania, żywotność oznaczano w komórkach 7-AAD-ujemnych, a oznaczanie CD34+ wykonywano w dwóch powtórzeniach. Dla metody SPM uzyskano liczbę komórek jądrzastych (NC) 213/nl ± ± 145 i dla DPM — 200/nl ± 130. Liczbę komórek

CD34+ odpowiednio $2,3/\text{nl} \pm 3,2$ i $2,1/\text{nl} \pm 3,0$. Dawka CD34+ wynosiła odpowiednio $7,8 \times 10^6/\text{kg}$ mc. biorcy $\pm 9,4$ oraz $7,1 \times 10^6 \pm 8,6$; żywotność CD34+: $94,8\% \pm 0,08$ oraz $96,0\% \pm 0,119$.

Uzyskane wyniki wykazały wysoką zgodność na wykresie Blanda-Altmana i wysoką korelację. Jednak w teście Wilcoxon-Manna-Whitneya dla sparowanych próbek wyniki różniły się znacząco. Prawdopodobnie zależało to od wysokiego współczynnika wariancji dla metody SPM w porównaniu z DPM. Obydwie metody dawały porównywalne wyniki dla NC, ale w metodzie SPM uzyskano o 9% wyższy wynik dla zawartości CD34+ i o 7% dla żywotności CD34+ w porównaniu z DPM, co w efekcie końcowym dało o 10% większą dawkę komórek CD34+ podczas oznaczania metodą SPM. Należy na to zwrócić uwagę podczas stosowania metod oznaczania komórek CD34+, gdyż można przeszacować uzyskane wyniki. Wagner nie stwierdził istotnej zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami liczby komórek a wynikami badań klinicznych.

Wiele prac poświęcono analizie wyników badań klinicznych uzyskiwanych w zależności od źródła komórek macierzystych, sposobu mobilizacji pacjenta, wpływu chemioterapii, możliwości wykorzystania komórek poddanych wstępnie namnażaniu czy terapii genowej. Ogółem zaprezentowano ponad 80 prac dotyczących terapii komórkowej.

Piśmiennictwo

- Schlenke P., Mertens A., Ahlke C. How do I collect and process stem cells? *Vox Sanguinis* 2010; 5 (1): 136–140.
- Humpe A., Buwitt-Beckmann U., Gramatzki M. When do I (not) release cellular products? *Vox Sanguinis* 2010; 5 (1): 141–147.
- Richter E., Tapernon K., Friedrich A.W. i wsp. Sterility testing of blood stem cell products is possible in the presence of 1 ml of a DMSO containing stem cell product. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1068.
- Pruss A., Mönig H.J. Current standards in tissue banking. *Vox Sanguinis* 2010; 5 (1): 148–154.
- Nikougoftar Zarif M., Soleimani M., Abolghasemi H. i wsp. The effect of micro RNA-10A down regulation in megakaryocytic differentiation of umbilical cord blood CD133+ cells. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 6B-S49-02.
- Müller-Steinhardt H., Lauber S., Latta M., Klüter H. Evaluation of cryopreserved cord blood units after long-term storage, experience of the Mannheim Cord Blood Bank. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 6B-S49-03.
- Rebulla P., Giordano R. Regulation of cell based medicine, the European experience. The case of mesenchymal stem cell production for clinical application. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 5C-S39-02.
- Rojewski M., Dausend J., Schmidtke-Schrezenmeier G., Schrezenmeier H. A standardized protocol from GMP compliant expansion of MSC from BM in an animal component free system. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 4C-S24-02.
- Xia W., Xu X., Fu Y. i wsp. Comparison of expansion culture conditions between the FCS and HPL in mesenchymal stem cells *ex vivo*. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1046.
- Peterbauer-Scherb A., Hildner F., Aberl J. i wsp. Substitution of fetal calf serum by platelet lysate for culture of adipose derived stem cells. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1055.
- Leitner G.C., Faschingbauer M., Fischer G., Weigel G. Does administration of rh-G-CSF to healthy volunteers induce epigenetic alteration in lymphocytes? *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 3B-S05-02.
- Hölig K., Kramer M., Blechschmidt M. i wsp. Peripheral blood stem cell mobilization in healthy related donors — higher risk of mobilization failure? *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 3B-S05-05.
- Worel N., Roszkopf K., Agis H. i wsp. Plerixafor plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from patients who previously failed chemotherapy and/or cytokine mobilization: the compassionate use experience in Austria. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 3B-S05-04.
- Worel N., Agis H., D'Addio A. i wsp. The addition of Plerixafor can rescue PBSC after mobilization in patients with suboptimal CD34 counts after mobilization regimens with chemotherapy and G-CSF. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1082.
- Schrezenmeier H., Feldmann U., Ottinger H. i wsp. Stem cell transplantation (SCT) for non-malignant disorders: impact of stem cells source and donor type on outcome — analysis of the German registry for stem cell transplantation (DRST). *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): 3B-S05-03.
- Kreissig C., Fischer I., Voelker G. Prediction of CD34-cell counts in peripheral blood and stem cell products after G-CSF mobilization in unrelated donors. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1074.
- Wagner U., Wittmann G., Grütznert S., Schramm W., Osterman H. Enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells in leukapheresis products for transplantation: comparison of a dual-platform method with a single platform kit. *Vox Sanguinis* 2010; 99 (supl. 1): P-1055.