

Wybrane doniesienia dotyczące postępu w terapiach komórkowych zaprezentowane podczas 37. Międzynarodowego Kongresu zorganizowanego przez *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Kuala Lumpur, 4–8 czerwca 2022 roku

Marta Stącel , Karolina Wrzodak 

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Stącel M, Wrzodak K. Advancement in cellular therapies: selected reports from the 37th International Congress organized by the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Kuala Lumpur, June 4–8, 2022. *J Transf Med* 2024; 17 (1): 29–32. DOI: 10.5603/jtm.99703. Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Komórki krwiotwórcze (KK) są wykorzystywane w leczeniu wielu schorzeń. Obecnie stosuje się je głównie w celu regeneracji układu krwiotwórczego po terapii mieloablacyjnej. Dostępne techniki krioprezewacji pozwalają na bezpieczne przechowywanie komórek macierzystych do czasu przeszczepienia. Pierwsze doniesienia o transplantacjach autologicznych pochodzą z lat 80. XX wieku. Od tego czasu terapia z wykorzystaniem komórek macierzystych znacznie się rozwinęła. Na 37. Kongresie ISBT, który odbył się w 2022 roku w Kuala Lumpur, poruszono tematy związane z pobieraniem, preparatyką oraz przechowywaniem krwiotwórczych komórek macierzystych, czego dotyczy również niniejsza praca.

Słowa kluczowe: terapie komórkowe; krwiotwórcze komórki macierzyste; transplantacje; choroby układu krwiotwórczego

J. Transf. Med. 2024; 17: 33–37

Wstęp

Międzynarodowe Towarzystwo Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*) zostało założone w 1935 roku i jest wiodącą organizacją zajmującą się zagadnieniami związanymi z transfuzjologią kliniczną i laboratoryjną, a także aspektami dotyczącymi bezpieczeństwa krwi i jej składników. W ramach działalności wspo-

mnianego towarzystwa na przestrzeni lat zorganizowano łącznie 37 kongresów międzynarodowych i 33 kongresy regionalne. Zjazd odbywający się w dniach 4–8 czerwca 2022 roku w Kuala Lumpur w Malezji, ze względu na obostrzenia związane z pandemią COVID-19, miał formę spotkania on-line. ISBT transmitowało ponad 60 sesji obejmujących prezentacje tematyczne, wywiady na żywo z ekspertami, a także dyskusje panelowe.

Adres do korespondencji: mgr Marta Stącel, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 88, faks: 22 349 63 76, e-mail: mstacel@ihit.waw.pl

Nadesłano: 20.11.2023

Przyjęto do druku: 28.11.2023

Data pierwszej publikacji: 29.03.2024

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Poruszano między innymi tematy związane z immunohematologią krwinek czerwonych, chorobami zakaźnymi przenoszonymi drogą krwi, metodami wspomagającymi bezpieczną transfuzję, immunobiologią płytek krwi i granulocytów, transfuzjologią kliniczną oraz zagadnieniami związanymi ze składnikami krwi i preparatami pochodzącymi z krwi. W prezentowanych pracach pojawiło się również wiele doniesień na temat pandemii wirusa SARS-CoV-2 i jej wpływu na terapie z wykorzystaniem krwi i jej składników, a także na temat trudności w wykonywaniu procedury pobierania i przeszczepiania komórek macierzystych.

Międzynarodowe doświadczenie i współpraca

Nowoczesne aspekty terapii komórkowych zostały omówione głównie podczas 11. sesji kongresu. Naukowcy rozważają rozwiązanie problemu niewystarczającej liczby dawców i zapewnienie stałego zaopatrzenia w krew za pomocą hodowli erytrocytów. Wpływ niedojrzałych komórek wywodzących się z układu czerwonokrwinkowego i wykazujących ekspresję markerów CD45+ i CD71+ na odpowiedź układu immunologicznego gospodarza nie jest na ten moment znany. A. Alshalani i wsp. [2] z holenderskiego University of Amsterdam oraz King Saud University w Arabii Saudyjskiej przedstawili pracę umożliwiającą scharakteryzowanie ekspresji markerów różnicowania powierzchniowego CD45+ oraz CD71+ w hodowlach komórek jednojądrzastych wywodzących się z linii erytroidalnej. Badano również wpływ na proliferację limfocytów T i stymulację powstawania komórek krwi. Od zdrowych ochotników pobrano próbki krwi pełnej, a następnie na 21 dni założono hodowlę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*), przy użyciu dedykowanego medium do wzrostu komórek erytroidalnych. Badano ekspresję markerów CD45+, CD71+ i CD235. W kolejnym kroku komórki CD71+ wyizolowano i inkubowano z limfocytami T lub z krwią pełną tego samego dawcy (próbkę kontrolną inkubowano z samą pożywką). Stwierdzono, że hodowle komórek erytroidalnych wykazują zdolność do stymulowania proliferacji limfocytów T oraz hamują wydzielanie IL-6 podczas stymulacji krwi pełnej, a więc ujawniają zdolności modulacyjne względem układu immunologicznego. Wyniki pracy sugerują również, że hodowlę erytrocytów należy kontynuować do momentu osiągnięcia przez komórki pełnej dojrzałości i utraty

pozostałych wewnątrzkomórkowych receptorów błony komórkowej.

Międzynarodowy zespół pod przewodnictwem L. Delila (Taipei, Tajwan) przedstawił pracę dotyczącą preparatyki nanofiltrowanego lizatu ludzkich krwinek płytkowych oraz ich neuroprotektoryjnego wpływu na uszkodzenia mózgu, zarówno urazowe, jak i wynikające z zachorowania na chorobę Parkinsona. Poddany obróbce cieplnej lizat ludzkich krwinek płytkowych (HPPL, *heat-treated human platelet pellet lysate*) jest bogaty w czynniki troficzne, takie jak neurotrofyny, przeciwutleniacze oraz białka przeciwzapalne. Podanie HPPL do obszarów mózgu może stanowić potencjalną nową terapię biologiczną dla pacjentów cierpiących na schorzenia neurodegeneracyjne i urazy ośrodkowego układu nerwowego. Aby uzyskać spójność między partiami, HPPL należy przygotować z pulowanych koncentratów krwinek płytkowych, co wymaga wdrożenia określonych metod (np. nanofiltracji) pozwalających na redukcję zawartości wirusów, które mogą być obecne w preparatach. Do oceny właściwości neuroprotektoryjnych i przeciwzapalnych nanofiltrowanego HPPL (NHPPL, *nanofiltered human platelet pellet lysate*) stworzono modele komórkowe oraz modele *in vitro*. Jako model choroby Parkinsona wykorzystano zróżnicowane ludzkie dopaminergiczne komórki neuronalne śródmózgowia (komórki Lunda). Wstępnie wyeksponowano je na działanie NHPPL, a następnie poddano 24-godzinnej ekspozycji na erastynę (neurotoksynę). Żywotność komórek badano ilościowo z wykorzystaniem testu CCK-8 (Cell Counting Kit 8, Sigma). Przeprowadzono także test *in vivo* na mysim modelu łagodnego urazowego uszkodzenia mózgu, służącego ocenie donosowego podania NHPPL w celu zmniejszenia ekspresji markerów prozapalnych mRNA (wykorzystano testy RT-PCR). NHPPL wykazywały wykrywalną neurotroficzność i posiadały obniżoną ekspresję związków prozakrzepowych, a także niższą aktywność prokoagulacyjną [3].

W innej pracy z Taipei (N. Le i wsp. [4]) dotyczącej lizatów ludzkich płytek krwi (HPL, *human platelet lysate*) przedstawiono badania dotyczące ich proteolitycznych właściwości, mogących przysłużyć się do optymalizacji zastosowań w terapiach komórkowych oraz biologicznych terapiach regeneracyjnych. Celem badań było odkrycie funkcji biologicznych różniących się między sobą HPL, aby zoptymalizować ich jakość, bezpieczeństwo i implementację kliniczną. Jako materiał służący do przygotowania różnego rodzaju lizatów płytkowych wykorzystano przeterminowane allogeniczne koncentraty krwinek płytkowych, uzyskane z Centrum

Krwiodawstwa w Taipei. Badano proteomikę bez wykorzystania znaczników poprzez wytrącanie białek acetonem, aby poznać ogólne zasady działania proteomów HPL. Ponadto HPL zostały pozbawione 14 dużych białek osocza. Peptydy uzyskane po trawieniu trypsyną podlegały następnie frakcjonowaniu w fazie odwróconej przy wysokiej wartości pH, a także analizie metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wyczerpanie białek interferujących pomogło zoptymalizować rozdzielczość osiągniętą w analizie proteomicznej, a metoda znakowania chemicznego białek z wykorzystaniem tandemowego znacznika masy (TMT, *tandem mass tag*) umożliwiła dokładniejsze oznaczenie ilościowe białek. Zidentyfikowano i oznaczono ilościowo łącznie 1441 białek w wyniku wolnej od znaczników LC-MS/MS. Oznaczone ilościowo zidentyfikowane białka zbadano w celu ich scharakteryzowania i wzmocnienia sygnału przy wykorzystaniu platform bioinformatycznych. Stwierdzono różnice w obecności białek pochodzenia płytkowego w poszczególnych HPL. Etapy otrzymywania i preparatyki składników krwi, w tym oddzielanie osocza czy filtracja, wpłynęły na skład HPL, co może mieć znaczenie dla ich funkcji w wykorzystywaniu klinicznym.

Podczas kongresu w ramach 18. sesji równoległej omówiono temat nowatorskich produktów pochodzących z krwi. Strong i wsp. [5] (USA) przedstawili pracę na temat modyfikowanych genetycznie za pomocą nanocząsteczek lipidowych mRNA płytek krwi, które funkcjonalnie przypominają płytki krwi przetaczane klinicznie. Dojrzałe płytki krwi mają zdolność do syntezy białek *de novo*, co czyni je podatnymi na terapię genową mRNA. Transfuzje preparatów płytkowych są niezbędne w leczeniu zapobiegającym krwawieniom, jednak często niewystarczające w przypadku wystąpienia silnego krwotoku.

Gessoni i wsp. [6] w swojej pracy wykorzystali komórki jednojądrzaste (MNC, *mononuclear cells*) do opracowania innowacyjnej metody terapii potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC, *triple-negative breast cancer*). W klinicznej fazie badań wykorzystano infuzję limfocytów dawcy (DLI, *donor lymphocyte infusion*). Zoptymalizowano i zstandaryzowano metody charakterystyki i izolacji MNC. Opracowano metody ekspansji komórek jednojądrzastych, zarówno z wykorzystaniem bioreaktora, jak i metod „otwartych”. Jednak przed rozpoczęciem klinicznej fazy badań konieczne będzie przeprowadzenie badania przedklinicznego, aby ocenić wyniki uzyskane z hodowli aktywowanego białka C (APC, *activated protein C*), pozyskanego

w wyniku ekspansji komórek jednojądrzastych w izolowanych z próbek materiału klinicznego w obecności komórek nowotworowych. Badania te rzucają pozytywne światło na międzynarodowe systemy opieki zdrowotnej, dzięki niższym kosztom terapii i wspieraniu zdrowia pacjentów, a przede wszystkim uzyskaniu lepszej jakości życia i jego zwiększonej średniej długości.

Z. Yusoff z National Blood Centre w Malezji (Kuala Lumpur) przedstawił drogę jednostki krwi pępowinowej jako najzasobniejszego rezerwuaru krwiotwórczych komórek macierzystych o potencjale regeneracyjnym, znajdujących zastosowanie w wielu chorobach genetycznych, nowotworach krwi, a także w procesach immunomodulacji. Bankowanie krwi pępowinowej to proces, który rozpoczyna zaraz po narodzinach dziecka. Z odciętej pępowiny pobiera się wówczas krew pępowinową, która jest przechowywana w stanie zamrożenia. Pierwszy Publiczny Bank Krwi Pępowinowej w Malezji został utworzony przez Ministerstwo Zdrowia w lipcu 2002 roku w Narodowym Centrum Krwiodawstwa (NBC, *National Blood Centre*). Aby zachować odpowiednio wysoką żywotność komórek macierzystych w materiale klinicznym, wszystkie etapy — począwszy od pobrania od dawców, przez preparatykę, po bankowanie krwi pępowinowej — podlegają standardowym procedurom operacyjnym. Opracowano i wprowadzono różne techniki preparatyki i kriokonserwacji krwi pępowinowej, koncentrując się na ilości i jakości komórek. Należy zweryfikować te metody, aby wykazać, że zachowana jest zarówno jakość, jak i ilość komórek progenitorowych/macierzystych [7].

Zespół pod przewodnictwem Useini opisał bezpieczeństwo oraz skuteczność pobierania metodą aferezy macierzystych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej u zdrowych dawców. Było to badanie retrospektywne przeprowadzone w Instytucie Medycyny Transfuzjologicznej w Północnej Macedonii i Uniwersyteckiej Klinice Hematologii (UCH) w latach 2000–2022. U wszystkich dawców wykonano badanie zgodności w zakresie antygenów układu HLA z antygenami biorcy. Dawcy zostali poinformowani o procedurze pobrania, a także poproszeni o podpisanie świadomej zgody na pobranie komórek. Minimalna dawka wymagana do zapewnienia udanego i trwałego przeszczepienia wynosiła 2×10^6 /kg komórek CD34+ lub 2×10^8 /kg MNC. Pobieranie PBSC przeprowadzano przy użyciu separatorów komórkowych o przepływie ciągłym Baxter CS3000, COBE Spectra i Terumo BCT Spectra Optia. Do mobilizacji zastosowano rekombinowany ludzki czynnik stymulujący wzrost

kolonii granulocytów (G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*). Jedynymi zaobserwowanymi reakcjami niepożądanymi były bóle kostne jako reakcja na G-CSF oraz drętwienie kończyn jako reakcja na ACD-A (hipokalcemia), które występowały rzadko i były bardzo łagodne.

W jednej z prac Chen i wsp. [9] (Taipei, Tajwan) opisali mobilizację oraz pobieranie komórek macierzystych z krwi obwodowej od zdrowych dziecięcych dawców z niską masą ciała. Badania oparte na 30-letnim doświadczeniu pracowników ośrodka transplantacyjnego w Taipei (*Taipei Veterans General Hospital*) pokazują, że w ciągu ostatnich kilku dekad nastąpił znaczny wzrost wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych do allogenicznej transplantacji u dzieci w przypadku złośliwych i niezłośliwych chorób układu krwiotwórczego. W badaniach wzięto pod uwagę charakterystykę demograficzną i kliniczną dawców, a także różne strategie mobilizacji związane z procedurą aferezy. Komórki macierzyste krwi obwodowej mobilizowane z wykorzystaniem cytokin (G-CSF) po 1990 roku stały się podstawą praktycznie wszystkich przeszczepów komórek macierzystych. Pobieranie komórek macierzystych krwi obwodowej od dzieci pozostaje wyzwaniem. Niższa masa ciała, mała objętość krwi obwodowej i podatność na zachorowania stanowią o wiele trudniejsze przeszkody do pokonania niż w przypadku dawców dorosłych. Pomimo większego skomplikowania procedury u pacjentów pediatrycznych, u wszystkich biorców objętych badaniem udało się uzyskać minimalną wymaganą zawartość PBSC podczas jedno- lub dwudniowego pobrania komórek macierzystych z krwi obwodowej metodą aferezy.

Daane i Robertson [10] (firma bioMérieux, Chicago, USA) podjęli się badań na próbkach pobranych z preparatów przeszczepowych w kierunku obecności bakterii z rodzaju *Mycoplasma*, przy wykorzystaniu szybkiej i łatwej metody badania w systemie BIOFIRE®Mycoplasma. System umożliwia uzyskanie wyników z próbki w ciągu ok. 1 godziny. Przedstawiono wyniki z dwóch wytwórni GMP (*Good Manufacturing Practice*) zajmujących się terapiami komórkowymi. Jednorazowy zestaw BIOFIRE®Mycoplasma zawiera wszystkie niezbędne odczynniki do automatycznej lizy komórek, oczyszczania kwasów nukleinowych, odwrotnej transkrypcji, pierwszego i drugiego etapu PCR oraz wykrywania analitów w celu wyizolowania, amplifikacji i wykrycia ponad 130 różnych gatunków mykoplazmy. Wszystkie testowane matryce użyte w terapii komórkowej (do 10^6 komórek CAR-T/ml), pożywki hodowlane, surowice i krioprotektanty

uznano za prawidłowe i nie odnotowano wyników fałszywie dodatnich. System BIOFIRE® FILMARRAY 2.0 Industry dobrze sprawdza się zarówno jako test do zwolnienia do zastosowania, jak i test kontroli procesu dla próbek wykorzystywanych do terapii komórkowej. Wyniki wykazały brak interferencji z produktem i wysoką czułość, zapewniając wiarygodność badania wykrywającego bakterie *Mycoplasma* w czasie krótszym niż godzina.

W kolejnej pracy zespół z Malezji pod przewodnictwem H. Low [11] porównał wyniki typowania HLA z próbek krwi oraz wymazu z policzka u pacjentów po przebytych transfuzjach składników krwi, którzy są przygotowani do przeszczepienia komórek macierzystych. Zespół badawczy określał różnice pomiędzy wynikami typowania HLA z DNA wyekstrahowanego z próbki krwi i próbki wymazu z policzka. Metody, które wykorzystano do badań, to pobranie próbek od łącznie 66 pacjentów z różnymi chorobami hematologicznymi, u których zaplanowano przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych. Pacjenci z powyższej grupy otrzymali co najmniej jeden preparat czerwonych krwinek lub płytek krwi między 1 a 14 dniem przed pobraniem próbki krwi. DNA zostało wyekstrahowane z wszystkich 66 próbek krwi i 66 próbek wymazu z policzka. Wszystkie próbki były typowane dla sześciu loci (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 i HLA-DPB1) za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *next-generation sequencing*). Nie wykazano różnic między wynikiem typowania HLA z DNA pobranego z próbki krwi lub próbki wymazu z policzka dla wszystkich 66 pacjentów. Z powyższego wynika, że próbki krwi pobrane od pacjenta, u którego przeprowadzono transfuzję krwi, można wykorzystać do typowania HLA zamiast próbek uzyskanych za pomocą pobrania wymazu z policzka. Przedstawione badanie ma charakter wstępny i skupia się tylko na dorosłych pacjentach z chorobami hematologicznymi (ALL, AML, CML, MDS, szpiczak mnogi, DLBCL, limfocystoza hemofagocytarna, chłoniak z komórek NKT i ciężka niedokrwistość aplastyczna).

Podsumowanie

Pomimo stosowania KK od wielu lat bardzo ważnymi zagadnieniami prezentowanymi podczas kongresu były doniesienia dotyczące pobierania, preparatyki i przechowywania komórek krwiotwórczych i podsumowujące wyniki wieloletnich doświadczeń. Przykładem może być badanie dotyczące zabiegów aferezy oraz reakcji niepożądanych

związanych z czynnikiem wzrostu G-CSF, podawanym przed pobraniem komórek krwiotwórczych, a także ACD-A stosowanym podczas aferezy (Uniwersytecka Klinika Hematologii w Skopje). Najczęstszą przyczyną przeszczepów allogeniczných w tym ośrodku była ciężka ostra białaczka szpikowa, która stanowiła 55,8% wszystkich wykonanych przeszczepów [8]. Wyniki pracy podsumowującej trudności w pobraniu PBSC od dawców o niskiej masie ciała (The National Institute w Taipei, Tajwan) pokazują, że wieloletnia praktyka pozwala na przeprowadzanie skomplikowanych procedur, które umożliwiają wystarczające pobranie PBSC nawet pomimo niewysokiej masy ciała dawcy [9]. Komórki krwiotwórcze i limfocyty stanowią źródło dla wielu nowych zastosowań. Przykładem jest projekt „Immuno-Cluster” zainicjowany w celu opracowania protokołu leczenia potrójnie ujemnego raka piersi, w którym wykazano, że komórki PBSC lub DLI, które wcześniej były kriokonserwowane, mogą być najskuteczniejsze w uzyskiwaniu szczepionki przeciwnowotworowej [6].

Doniesienia z kongresu ISBT wskazują, że komórki krwiotwórcze są powszechnie stosowane. Wiele ośrodków na świecie dąży do udoskonalenia procedur przeszczepiania PBSC, a także implementacji nowych technologii, które mogą być skuteczne w leczeniu wielu chorób, nie tylko hematologicznych.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation — 50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J.* 2014; 5(4): e0028, doi: [10.5041/rmmj.10162](https://doi.org/10.5041/rmmj.10162), indexed in Pubmed: [25386344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25386344/).
2. Alshalani A, Beuger BM, van Bruggen R, et al. Cultured CD71+ erythroid cells modulate the host immune response. *Transfus Med.*; 33(3): 257–262, doi: [10.1111/tme.12964](https://doi.org/10.1111/tme.12964), indexed in Pubmed: [36919690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36919690/).
3. Le N, Han C, Delila L, et al. Proteomics studies of human platelet lysates for optimized applications in cell therapies and regenerative biotherapies. *Vox Sang.* 2022; 39(117(S1)): PA11–L04.
4. Delila L, Nebie O, Le N, et al. Preparation and neuroprotective activity of nanofiltered human platelet lysate in Parkinson's disease and traumatic brain injury models. *Vox Sang.* 2022; 39(117(S1)): PA11–L03.
5. Strong C, Leung J, Badior K, et al. Platelets genetically modified with mRNA-lipid nanoparticles are functionally similar to clinically transfused platelets in vitro. *Vox Sang.* 2022; 52(117(S1)): PA18–L02.
6. Gessoni G, Curcio F, Zorec R, et al. Interreg immunocluster: An international cooperative project to assess feasibility of an immuno hybridoma based approach to treatment of triple negative breast cancer. *Vox Sang.* 2022; 247(117(S1)): P293.
7. Yusoff Z. Public cord blood bank in Malaysia: From the quality perspective and technical measures. *Vox Sang.* 2022; 247(117(S1)): P294.
8. Useini S, Grubovic Ra, Georgievski B, et al. Safety and efficacy of apheresis collection of haematopoietic stem cells from peripheral blood in healthy donors. *Vox Sang.* 2022; 248(117(S1)): P297.
9. Chen W, Chien S, Liu C. Peripheral blood stem cell mobilization and collection in healthy paediatric sibling donors with low body weight: a single center experience in Taiwan. *Vox Sang.* 2022; 249(117(S1)): P299.
10. Daane L, Robertson J. Testing cell therapy samples for mycoplasma: Sample to result in less than an hour. *Vox Sang.* 2022; 250(117(S1)): P300.
11. Low H, Mohd Az. HLA typing for post-transfused patient: comparison between blood and buccal swab sample. *Vox Sang.* 2022; 252(117(S1)): P302.