

KOMÓRKI MACIERZyste KRWI PĘPOWINOWEJ

STEM CELLS OF CORD BLOOD

Magdalena STOLAREK, Andrzej MYŚLIWSKI

Katedra Histologii i Immunologii, Zakład Histologii, Akademia Medyczna
w Gdańsku

Streszczenie: Krew pępowinowa jest alternatywnym źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), w stosunku do szpiku kostnego i krwi obwodowej. Zaletą krwi pępowinowej (KP) jako źródła KKM jest to, że jest ona względnie łatwo dostępna, a ponadto jej KKM mają większy potencjał proliferacyjny i po przeszczepieniu wywołują reakcję GvH mniej nasiloną niż KKM ze szpiku kostnego i krwi obwodowej. Natomiast wadą jest niewielka ilość KP uzyskiwana jednorazowo, a więc i liczba KKM. W praktyce służyć może jedynie do przeszczepów allogeniczných, chociaż propagowane jest, głównie ze względów komercyjnych, bankowanie KP dla ewentualnych przyszłych przeszczepów autologicznych. Jednak nie ma dowodów, że przechowywane przez wiele lat KKM będą równie wartościowe jak świeżo uzyskane. Wiele doniesień wskazuje na to, że KP może być źródłem innych komórek macierzystych niż krwiotwórcze, a mianowicie: neurogennych, kardiomiogennych, mezenchymatycznych, hepatogennych i prekursorowych dla wysp trzustkowych. Jednak publikowane wyniki tych badań nie dla wszystkich są przekonujące.

Słowa kluczowe: krew pępowinowa, krwiotwórcze komórki macierzyste, przeszczep.

Summary: Cord blood is alternative source of the haematopoietic stem cells (HSC) in relation to bone marrow and peripheral blood. Advantage of the cord blood (CB) is its relative accessibility as a source of HSC. HSC of CB present bigger proliferative potential than HSC of bone marrow and peripheral blood. Moreover they evoke weaker GvH reaction. The disadvantage of CB is its small amount obtainable once for all. It can be applied to allogenic transplantation only, although, the banking of CB is becoming popular as a source of HSC for future autologous transplantation. However, it is not proved that HSC after many years of banking will be as good for transplantation as freshly obtained. Quite a number of publications suggest that CB can be a source of stem cells other than haematopoietic, such as: neurogenic, cardiomyogenic, mezechymal, hepatogenic and precursors of Langerhans islets of pancreas. Yet, not all accept the results of those investigations.

Key words: cord blood, haematopoietic stem cells, transplantation.

WSTĘP

Głównym problemem związanym z przeszczepami szpiku kostnego jest znalezienie zgodnego dawcy. Mimo że międzynarodowe rejestry liczą już ponad 9 mln dawców szpiku, wciąż nie udaje się znaleźć odpowiedniego materiału przeszczepowego dla około 40% ludzi chorych. Krew pępowinowa stanowi dodatkowe alternatywne źródło krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), które mogą zostać wykorzystane w czasie przeszczepów zarówno allogenicznych, jak i autologicznych zwiększając tym samym pulę potencjalnych dawców i zmniejszyć poziom śmiertelności wśród oczekujących na przeszczep. Po raz pierwszy zostało to potwierdzone po transplantacji komórek krwi pępowinowej dziecku cierpiącemu na ciężką niedokrwistość (anemię Fanconiego) w roku 1988 [22]. W 1993 roku przeprowadzono pierwszą transplantację niespokrewnionemu biorcy krwi pępowinowej wcześniej zbankowanej i zamrożonej [56]. W 1996 roku Wagner i wsp. [66] przedstawili dowody na to, że zamrożona porcja krwi pępowinowej zawiera liczbę komórek macierzystych wystarczającą do repopulacji szpiku biorcy-dziecka przy niższym ryzyku odrzutu przeszczepu w porównaniu z przeszczepami szpiku kostnego. Od tamtej pory zgromadzono już ponad 130 tysięcy porcji komórek macierzystych krwi pępowinowej i przeprowadzono ponad 3500 przeszczepów w terapii chorób nowotworowych, zaburzeń hematologicznych i chorób dziedzicznych [21,23,24]. Wadą krwi pępowinowej jako źródła KKM jest to, że liczba tych komórek uzyskiwana z jednej porcji krwi pępowinowej jest mniejsza niż liczba analogicznych komórek uzyskiwana ze szpiku kostnego czy mobilizowanej krwi obwodowej, w związku z tym największe zastosowanie krew pępowinowa ma do przeszczepów u dzieci. Aczkolwiek, wykonuje się już zabiegi przeszczepiania kilku porcji krwi pępowinowej jednemu dorosłemu dawcy [3,47], ponieważ liczba przeszczepianych komórek jednej porcji bywa poważnym ograniczeniem [42,67]. Na świecie przeprowadzono już bardzo wiele zabiegów przeszczepiania komórek macierzystych krwi pępowinowej biorcom dorosłym cierpiącym na choroby nowotworowe [43,55] i ciężkie zaburzenia hematologiczne. Dowiedziono, że do powodzenia przeszczepu komórek macierzystych u ludzi dorosłych wystarcza nawet niewielka objętość krwi pępowinowej [42]. Wyniki tych badań sugerują, iż krew pępowinowa może być z powodzeniem wykorzystywana jako alternatywne źródło komórek do całkowitej odbudowy szpiku kostnego dorosłego biorcy niemającego całkowicie zgodnego dawcy [32]. Wyniki badań Rocha i wsp. [55] nie wykazały istotnych różnic w wartościach parametrów, takich jak: śmiertelność czy stopień niepowodzenia przeszczepu pomiędzy biorcami całkowicie zgodnego szpiku kostnego oraz niezgodnej krwi pępowinowej. Inne doświadczenia potwierdziły jednak wyższość szpiku kostnego o 100% zgodności nad innymi źródłami komórek do przeszczepu [43].

Badania pokazują, że czas przeżycia bez nawrotu choroby jest porównywalny do tego uzyskiwanego po przeszczepie komórek macierzystych/prekursorowych ze szpiku kostnego oraz mobilizowanej krwi obwodowej. Przeszczepy komórek krwi pępowinowej są jednak związane z opóźnieniem efektu zasiedlania szpiku kostnego i odbudowy hematopoezy w porównaniu z komórkami ze szpiku kostnego [55]. Po przeszczepieniu

pacjentom krwi pępowinowej, gdy występowała najczęściej niezgodność pod względem dwóch lub więcej antygenów HLA, odnotowano niewielki odsetek ciężkiej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *Graft versus Host Disease* – GVHD). Testy kliniczne wykazały, że skuteczny stosunek ilości komórek CD34⁺ krwi pępowinowej na kg ciała biorcy wynosi 1–3,7 x 10⁶/kg, co stanowi zaledwie dziesiątą część tej ilości potrzebnej do przeszczepu szpiku kostnego (10–41 x 10⁶/kg), co wskazuje na wysoki potencjał proliferacyjny tych komórek [9].

Krew pępowinowa jest bogatym źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych, zawiera także więcej naiwnych limfocytów T niż szpik kostny, co zapobiega wystąpieniu ostrej reakcji GVHD. Możliwość uzyskania pełnej zgodności w przypadku krwi pępowinowej jest możliwa w przypadku przeszczepu autologicznego, a przy przeszczepie allogenicznym niezgodność 1–3 antygenów HLA jest tolerowana przez organizm biorcy. Przeszczepy komórek krwi pępowinowej nawet o częściowej niezgodności antygenów HLA są mniej alloreaktywne niż przeszczepy komórek macierzystych ludzi dorosłych [30].

Dodatkową zaletą stosowania krwi pępowinowej jako alternatywnego źródła KKM jest szybsza i nieinwazyjna procedura pozyskiwania, a przez to jednocześnie bezpieczna dla noworodka i dla matki. Ważne również jest minimalne ryzyko zakażenia wirusem CMV [54]. Jest to związane z tym, że <0,1% zdrowych noworodków jest zakażone tym wirusem, podczas gdy ochotnicy dorośli w 10–60% są nosicielami cytomegalowirusa [30]. Czas pozyskiwania i przygotowania do przeszczepu zgodnej porcji komórek macierzystych jest o wiele krótszy w przypadku krwi pępowinowej niż w przypadku szpiku kostnego, w którym wynosi co najmniej 4 miesiące. Tak wydłużony okres oczekiwania na komórki szpikowe do przeszczepu związany jest z długą procedurą znalezienia odpowiedniego dawcy oraz przygotowania go do zabiegu pobrania krwi szpikowej. Ponieważ krew pępowinowa jest mrożona i przechowywana w bankach, jest ona łatwo dostępna i czas ten ulega skróceniu do kilku tygodni. Jest to szczególnie ważne dla pacjentów cierpiących na ciężkie, niestabilne choroby. Ze względu na fakt starzenia się populacji komórek macierzystych, te wyizolowane z krwi pępowinowej zawierają wiele „młodych” komórek macierzystych o wyższym potencjale proliferacyjnym, dłuższych telomerach oraz zdolności do tworzenia większych kolonii *ex vivo* w porównaniu z analogiczną populacją pochodzenia szpikowego [21]. Dodatkową zaletą jest brak ograniczeń natury etycznej związanych z pobraniem krwi pępowinowej, co stanowi poważny problem w przypadku embrionalnych komórek macierzystych. Jednakże istnieje jednocześnie ryzyko, że przeszczepiane komórki będą naznaczone genetycznymi zmianami. Przeprowadzany przed pobraniem krwi pępowinowej wywiad rodzinny dotyczący chorób nowotworowych i dziedzicznych, jakie pojawiły się w rodzinie noworodka daje częściową pewność. Aczkolwiek wiele chorób, których zagrożenie niosą geny dziecka - dawcy, dopiero po latach może się ujawnić.

KRWIOTWÓRCZE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) stanowią 5–10% leukocytów mobilizowanej krwi obwodowej [32] oraz następujący odsetek komórek jednojądrzastych: krwi pępowinowej – 0,1–0,5% i szpiku kostnego – 0,5–3%. Są to najprymitywniejsze prekursorzy komórek wszystkich linii hematopoezy zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* dają wzrost wszystkim liniom krwiotwórczym. Mają zdolność do somopielania utrzymując tym samym stałą pulę komórek pluripotencjalnych począwszy od wczesnych faz rozwoju embrionalnego poprzez całe dorosłe życie osobnika.

Do identyfikacji i izolacji krwiotwórczych komórek macierzystych używane są markery powierzchniowe, tj. CD34, CD45, CD38, c-Kit. Antygen CD34 jest glikoproteiną eksponowaną na powierzchni KKM i komórek progenitorowych, chociaż zidentyfikowano niewielką populację komórek krwi pępowinowej o właściwościach komórek macierzystych i o fenotypie CD34⁻. Stwierdzono, że komórki o fenotypie Lin⁻CD34⁻ ludzkiej krwi pępowinowej i wykazujące jednocześnie koekspresję markera CD133 były zdolne odtworzyć hematopoezę u myszy NOD/SCID (ang. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*). Aczkolwiek wydajność tego procesu była niższa w porównaniu z ich odpowiednikami o fenotypie CD34⁺ [18]. Ostatnie badania sugerują, że tak niska zdolność komórek CD34⁻ do repopulacji szpiku myszy z niedoborami immunologicznymi może być spowodowana tym, że komórki te nie docierają do szpiku po dożylniej iniekcji. Podanie komórek CD34⁻ krwi pępowinowej bezpośrednio do szpiku dało rezultat porównywalny do otrzymanego po przeszczepieniu komórek CD34⁺ [68].

W praktyce laboratoryjnej w celu określenia potencjału proliferacyjnego krwiotwórczych komórek zdeterminowanych liniowo stosuje się testy klonogenne (CFU-GM; CFU-GEMM; BFU-E) [34] i hodowlane (LTCIC) [70]. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego koktajlu cytokin oraz ściśle zdefiniowanych pożywek można rutynowo prowadzić hodowlę ludzkich erytroblastów, megakarioblastów oraz prekursorów linii granulocytowo-monocytarnej. Testy klonogenne umożliwiają ocenę potencjału proliferacyjnego wczesnych prekursorów krwiotworzenia na podstawie liczby i wielkości utworzonych przez te komórki kolonii. W porównaniu z komórkami macierzystymi ludzi dorosłych, KKM krwi pępowinowej tworzą większe kolonie *in vitro* oraz wymagają innych warunków hodowli [21]. Dodatkowo tego typu testy mają szerokie zastosowanie w klinice w czasie diagnozowania chorób hematologicznych. Ponadto liczbę komórek macierzystych ocenić można przy wykorzystaniu testów *in vivo* na podstawie szybkości i stopnia odtworzenia przez te komórki hematopoezy u myszy z niedoborami immunologicznymi, u których upośledzona jest funkcja podstawowych komórek układu immunologicznego: limfocytów B, T u myszy SCID oraz dodatkowo komórek NK u myszy NOD/SCID [30]. Wszczepione komórki krwi pępowinowej osiedlają się w szpiku zwierzęcia doświadczalnego i przejmują funkcje defektywnych mysich krwiotwórczych komórek macierzystych [29,68].

Najczęściej stosowaną metodą określania immunofenotypu komórek macierzystych/progenitorowych jest cytometryczna analiza obecności markerów, tj. CD34, CD45 na powierzchni komórek po wyznakowaniu ich odpowiednimi przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami.

Ze względu na wyjątkową rzadkość KKM metody ich izolacji muszą być niezwykle precyzyjne. Obecnie stosuje się rutynowo kilka metod pozwalających na identyfikację oraz selekcję komórek macierzystych/prekursorowych wszystkich linii hematopoezy [70].

Dwie z nich wymagają zastosowania specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko markerom obecnym na powierzchni docelowych komórek. W przypadku KKM i komórek prekursorowych są to receptory: CD34, CD45, CD117, c-Kit i inne. Przy pomocy cytometru sortującego izoluje się komórki wyznakowane przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami. Do izolowania wykorzystuje się także wartości parametru FSC (*forward scatter*), korelującego z wielkością komórek oraz SSC (*side scatter*), odzwierciedlającego ilość ziarnistości w badanych komórkach.

Metoda immunomagnetyczna MACS® wykorzystuje magnetycznie znakowane przeciwciała. Selekcja pozytywna pozwala na zatrzymanie docelowych, wyznakowanych komórek na kolumnie umieszczonej w polu magnetycznym. Pozyskuje się je poprzez wypłukanie buforem z kolumny usuniętej wcześniej z pola magnetycznego. W czasie selekcji negatywnej docelowa frakcja komórek niewyznakowanych eluuje z kolumny podczas przepłukiwania buforem.

Komórki uzyskane w wyniku izolacji metodą immunomagnetyczną dają większą liczbę kolonii w porównaniu z komórkami uzyskanymi przy pomocy cytometru sortującego [61].

Do izolowania wczesnych komórek krwiotwórczych wykorzystuje się również barwienie fluorochromami metabolicznymi, tj. Rodaminą 123 czy Hoechst 33342 [62]. Izolacja chemotaktyczna zaś wykorzystuje zdolność komórek prekursorowych poszczególnych linii ukierunkowanych do chemotaksji w kierunku chemoatraktantów (SDF-1; LIF, SF/MGF) regulujących ich migrację w czasie ontogenezy [41].

NIEKRWIOTWÓRCZE KOMÓRKI MACIERZyste KRWI PĘPOWINOWEJ

Komórki macierzyste krwi pępowinowej o właściwościach neurogennych

Nadzieją terapii chorób neurodegeneracyjnych, urazów i udarów mózgu jest znalezienie łatwo dostępnego źródła nerwowych komórek macierzystych. Potomstwo takiej komórki mogłoby zastąpić uszkodzone neurony, astrocyty i oligodendrocyty w obszarze mózgu człowieka dotkniętym patologią. Zaobserwowano, że wszczepione myszom zaraz po urodzeniu nerwowe komórki macierzyste były zdolne różnicować się w komórki o funkcjach i budowie odpowiednich dla danego obszaru mózgu integrując się jednocześnie z komórkami gospodarza. Takie komórki mogą zostać wyposażone w transgeniczny gen mogący naprawić defekt genetyczny oraz poprawić funkcjonowanie mózgu [16]. Ostatnie badania pokazały także, że komórki wyizolowane ze szpiku dorosłego człowieka mogą wykazywać ekspresję markerów komórek tkanki nerwowej

[57]. Podobne komórki po podaniu dożylnym mają potencjał migrowania i akumulacji w mózgu szczura, gdzie część z nich wykazuje ekspresję markerów komórek nerwowych i glejowych [5,8].

Obecnie prowadzone są na szeroką skalę badania mające na celu zidentyfikowanie komórek macierzystych tkanki nerwowej we krwi pępowinowej. Otrzymane w specyficznych warunkach *in vitro* oraz *in vivo* komórki układu nerwowego stanowiłyby środek terapeutyczny do regeneracji upośledzonych funkcji tego układu.

Dane literaturowe dowodzą, że pierwsze takie próby powiodły się. Po hodowli komórek macierzystych z krwi pępowinowej w obecności czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor* – NGF) i kwasu retinowego (ang. *retinoic acid* – RA) wykazano wzrost ekspresji markerów specyficznych dla neuronów i komórek gleju oraz spadek ekspresji genów związanych z krwiotworzeniem [58]. Badania Bużyńskiej i wsp. [6] dowiodły po raz pierwszy, że komórki wszystkich trzech typów (astrocyty, neurony, oligodendrocyty) obecne w ludzkim mózgu można uzyskać *in vitro* z prekursorów otrzymanych z krwi pępowinowej. Komórki CD34⁻CD45⁺ krwi pępowinowej w obecności epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) wykazywały ekspresję nestyny, markera prekursorów komórek układu nerwowego [46]. Nestynopoztywne klony wysiane na podłożu z RA i neurotrofowym czynnikiem BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) nabierały cech fenotypowych oraz morfologicznych komórek nerwowych. Efekt ten był wielokrotniony po wysianiu ich na hodowlę szczurzego mózgu. Stwierdzono także bipotencjalność tych prekursorów. Komórki należące do tego samego klonu miały markery dwóch subpopulacji: neuronów i astrocytów oraz neuronów i oligodendrocytów. Podobne wyniki uzyskano hodując w obecności czynnika wzrostu fibroblastów bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) i hEGF multipotentjalne komórki krwi pępowinowej CD45⁻, niemające potencjału krwiotworzenia. Ekspresja markerów na powierzchni tych komórek potwierdziła bipotencjalność prekursorów, które miały wspólny fenotyp komórek glejowych i neuronów [4]. Podobną koekspresję markerów stwierdzono po hodowli ludzkich, nieukierunkowanych, somatycznych komórek macierzystych krwi pępowinowej, tzw. populacji USSC (ang. *Unrestricted Somatic Stem Cells*) o fenotypie CD45⁻HLAII⁻ [38]. Hodowla *in vitro* tych komórek nie dała pełnofunkcjonalnych neuronów, aczkolwiek wykazano ekspresję specyficznych markerów. Prawdopodobnie przyczyną tego była niedoskonała mimikra mikrośrodowiska hodowli do warunków panujących *in vivo*. Przeszczepione komórki USSC do mózgu dorosłego szczura wykazywały wysoki potencjał migracyjny, ponadto w niektórych rejonach mózgu znaleziono ludzkie komórki o prawidłowej i dojrzałej morfologii komórek neuronopodobnych [38]. Inne badania dowiodły, że jednojądrzaste komórki krwi pępowinowej człowieka po przeszczepieniu do rozwijającego się mózgu szczura wykazywały 20% przeżycie bez immunosupresji. Przynajmniej niektóre z nich nabywały fenotypu komórek glejowych lub neuronów po ekspozycji na działanie sygnałów od dojrzewającej tkanki mózgowej szczura [71]. Dożylnie podane szczurom komórki krwi pępowinowej osiedlały się w okolicy mózgu dotkniętej udarem, a dokładniejsze badania pokazały, że niektóre ze wszczepionych komórek wykazywały ekspresję markerów astrocytowych i neuronowych oraz były zaangażowane w odbudowę uszkodzonej tkanki. W warunkach *in vitro* komórki te

wykazywały powinowactwo do uszkodzonej tkanki mózgowej, podczas gdy nie obserwowano tego w przypadku zdrowej tkanki [7]. Wielu z przytoczonych tutaj badaczy zanotowało regenerację uszkodzonej tkanki mózgowej po podaniu zwierzętom komórek macierzystych krwi pępowinowej. Taguchi i wsp. [63] proponują hipotetyczne wyjaśnienie procesów za to odpowiedzialnych. Po podaniu komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej zanotowano wzrost intensywności procesów angiogenezy, neurogenezy, regeneracji morfologicznej i funkcjonalnej mózgu szczura po udarze. Takie same obserwacje zanotowano również w czasie innych doświadczeń [7,59]. Ciągłe zagadkowa była mała liczba wszczepionych komórek przy znacznej regeneracji funkcji mózgu zwierzęcia doświadczalnego. Taguchi i wsp. [63] pokazali, że komórki CD34⁺ mają wprawdzie niski potencjał inkorporacji do tkanki mózgowej szczura, lecz prawdopodobnie stymulują odtworzenie unaczynienia zniszczonego obszaru oraz znoszą efekt supresji neurogenezy. Neurogeneza była stymulowana przez procesy neowaskularyzacji obszaru kory mózgowej szczura i zachodziła dzięki migracji neuroblastów, które w miejscu uszkodzenia dojrzywały i były odpowiedzialne za odtworzenie funkcji mózgu. Badania na mysim modelu choroby Parkinsona dowiodły, że wszczepione komórki krwi pępowinowej istotnie opóźniły pojawienie się objawów choroby oraz śmierć zwierzęcia [13].

We krwi pępowinowej zidentyfikowano również populację pozytywną pod względem obecności markerów mezenchymalnych komórek macierzystych o immunofenotypie SH2⁺CD13⁺CD29⁺ASMA⁺, która pod wpływem odpowiednich czynników neurogennych gwałtownie różnicowała się w wielopolarne neurony [35]. Inna grupa badaczy na zasadzie negatywnej selekcji immunomagnetycznej wyizolowała z krwi pępowinowej komórki Lin⁻, stanowiące prawdopodobnie prymitywną populację komórek macierzystych, która ma potencjał różnicowania się zarówno w komórki krwi, jak i komórki tkanki nerwowej. Zaobserwowano wczesną transdyferencjację tych komórek do prekursorów neurogleju. Rozwijające się komórki wydzielają do podłoża endogenne czynniki neuropoezy, tj. TGFβ1, GDNF – neurotropowy czynnik produkowany przez komórki glejowe, (ang. *glial cell line-derived neurotrophic factor*) czy NGF stymulujące dalsze etapy różnicowania [49].

Wydaje się, że rzeczywiście krew pępowinowa może być źródłem komórek macierzystych o właściwościach neurogennych. Niestety dotychczasowych wyników nie można traktować jako ostatecznych dowodów, ponieważ dotyczą one populacji o zbyt odmiennych fenotypach, hodowanych w różnych warunkach.

Komórki mezenchymalne krwi pępowinowej

Od dawna wiadomo, że krew pępowinowa zawiera krwiotwórcze komórki macierzyste [22], natomiast wciąż kontrowersyjną kwestią pozostaje obecność mezenchymalnych komórek macierzystych (MKM), które miałyby potencjał różnicowania się w komórki kości, chrząstki, tkanki tłuszczowej czy mięśniowej. Chociaż Friedenstein i wsp. [17] już w 1970 roku opisali obecność komórek o takim potencjale oraz pokazali, że długoterminowa hodowla komórek szpikowych sprzyjała powstawaniu komórek zrębu (CFU-F), to stosunkowo niedawno skojarzono te komórki z funkcją

multipotencjalnych komórek, nazwanych mezenchymatycznymi komórkami macierzystymi i stwierdzono, że są one zdolne do różnicowania się w komórki kości, chrząstki, mięśni, śródbłonna i tkanki tłuszczowej [53]. Procedura ich pozyskania jest jednak bardzo niekorzystna dla dawcy, dodatkowo udowodniono, że ich liczba i potencjał różnicowania spadają wraz z wiekiem [12]. Dlatego właśnie we krwi pępowinowej jest pokładana nadzieja na pozyskanie alternatywnego źródła komórek o aktywności MKM, o większym potencjale proliferacyjnym, o dłuższych telomerach oraz mniejszych wymaganiach co do warunków hodowli [51]. Przy tym w literaturze znaleźć można prace o wręcz przeciwnych wynikach, co wskazuje jak trudne zadanie stoi przed badaczami.

Mareschi i wsp. [48] wykazali, że możliwe jest otrzymanie MKM z adherentnych komórek szpikowych, podczas gdy dla krwi pępowinowej w takich samych warunkach hodowli procedura ta nie powiodła się. Poza tym w przeciwieństwie do wyników badań Gutierrez i wsp. [26], którzy pokazali co najmniej 60-procentowy udział komórek dendrytycznych CD1a⁺ w warstwie przylegającej, to zespół Mareschi [48] nie znalazł dowodów na istnienie tej populacji. Różnica ta prawdopodobnie wynika z warunków hodowli jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej. Wyniki badań Erices i wsp. [14] pokazują zaś, że jednojądrzaste komórki krwi pępowinowej zawierają mezenchymalne prekursorzy o morfologii podobnej do fibroblastów oraz ekspresji specyficznych antygenów. Ponadto obecność komórek wielojądrzastych wykazujących aktywność fosfatazy TRAP (ang. *tetrate-resistant acid phosphatase*) we frakcji przylegającej, sugeruje spontaniczną dyferencjację monocytów w osteoklasty. Również spośród homogennej przylegającej frakcji jednojądrzastych komórek z zamrożonej krwi pępowinowej otrzymano populację o profilu ekspresji genów oraz fenotypie mezenchymalnych komórek macierzystych. Miały one potencjał formowania komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej [44]. Szeroki potencjał adherentnych komórek krwi pępowinowej potwierdziły badania Ganga i wsp. [20], gdzie pod wpływem określonych warunków komórki te dały osteoblasty, chondrocyty, adipocyty oraz mioblasty mięśni szkieletowych. Do przeciwnych wniosków doszedł zespół Wexlera [69], który spośród jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej nie zidentyfikował mezenchymalnych komórek macierzystych. Frakcja komórek krwi pępowinowej w odróżnieniu od populacji szpikowej nie dawała homogennej przylegającej frakcji, nie poddawała się pasażom oraz nie różnicowała się w komórki linii mezenchymalnej.

W swojej pracy Goodwin i wsp. [25] stwierdzili, że komórki krwi pępowinowej mają wysoki potencjał różnicowania, przy czym potomne komórki były pozytywne pod względem markerów komórek kości, tkanki tłuszczowej i nerwowej (pochodzenia ektodermalnego). Poza tym wydaje się, że komórki macierzyste krwi pępowinowej są bardziej prymitywną populacją w porównaniu z analogiczną populacją szpiku kostnego. Lee i wsp. [45] opracowali metodę izolacji MKM z krwi pępowinowej niewykazujących ekspresji markerów dojrzałych komórek, ale mających markery mezenchymalnych komórek macierzystych. W odpowiednich warunkach różnicowały się one w komórki tkanki tłuszczowej, kostnej i chrzęstnej. Dodatkowo te izolowane komórki różnicowały się w komórki o fenotypie neurogleju i hepatocytów. Wyniki tych badań dowiodły, że

MKM mogą być czymś więcej niż tylko mezenchymalnymi prekursorami, gdyż mogą różnicować się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. W związku z powyższym sugeruje się zmianę nomenklatury na „niekrwiotwórcze prekursorzy” w odniesieniu do komórek krwi pępowinowej o wieloliniowym potencjale [25].

W literaturze znajdują się także prace opisujące subpopulacje CD34⁻ lub/i CD45⁻ krwi pępowinowej bogate w mezenchymalne komórki macierzyste. Hodowla ludzkich komórek krwi pępowinowej o fenotypie CD34⁻CD45⁻Lin⁻ z komórkami mysich zawiązków kończyn stwarza odpowiednie warunki dla różnicowania się i dojrzewania ludzkich chondrocytów. Ta subpopulacja ma wprawdzie również potencjał krwiotwórczej komórki macierzystej, jednak wydaje się, że nie jest to jej dominująca ścieżka rozwojowa. Lokalizacja komórki we krwi pępowinowej nie musi determinować jej losu jako krwiotwórczej komórki macierzystej. Zdolność do różnicowania się w chondrocyty prawdopodobnie nie jest także ich funkcją fizjologiczną, a tylko zjawiskiem odnotowanym *ex vivo* [33]. Immunohistochemiczne badania na myszach z dystrofią mięśni po wszczepieniu im komórek CD34^{+/}-Lin⁻ ludzkiej krwi pępowinowej dowiodły, że krew pępowinowa może być źródłem prekursorów włókien mięśni szkieletowych produkujących ludzką dystrofinę, nawet 12 tygodni po przeszczepie [39]. Obecność komórek o podobnym potencjale we krwi pępowinowej stwierdzono także w innej pracy, gdzie warstwa przylegających komórek krwi pępowinowej nabierała fenotypu MKM, by w wyniku odpowiedniej stymulacji różnicować się wzdłuż ścieżki miogenezy [19]. Wspomniana wcześniej populacja komórek krwi pępowinowej USSC ma potencjał tworzenia klonów prekursorów linii dwóch listków zarodkowych: mezodermy oraz ektodermy [38]. Na podstawie analizy ekspresji genów, immunofenotypu oraz morfologii stwierdzono różnicowanie się komórek USSC w komórki hematopoezy, osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, komórek tkanki nerwowej. Różnicowanie się *in vivo* komórek USSC potwierdziły wyniki badań wykonanych w warunkach *in vitro*. Populacja USSC [38] ma znacznie szerszy potencjał niż mezenchymalne komórki macierzyste ze szpiku kostnego, różnią je także cechy fenotypowe i molekularne [10]. Ludzkie komórki USSC wykazywały potencjał migracyjny w stronę ścian przedsionków, komór i przegrody serca oraz systemu włókien Purkiniego po przeszczepieniu *in utero* do serca owcy. Zarówno komórki gospodarza-owcy, jak i przeszczepione – ludzkie wykazywały prawidłową lokalizację dystrofiny i były nierozróżnialne. Wszczepione ludzkie komórki miały cechy normalnego kardiomiocyty i mogły prawdopodobnie również normalnie funkcjonować [38]. W przypadku MKM ze szpiku kostnego obserwowano wyłącznie dojrzewanie ludzkich komórek Purkiniego w sercu owcy [1]. Znaczyć to może, że komórki USSC są mniej zróżnicowane niż MKM, prawdopodobnie będąc jednocześnie prekursorami MKM. Jeśli wyniki te się potwierdzą, to populacja ta w przyszłości może stać się uniwersalnym źródłem komórek do przeszczepów komórkowych [38]. Podobne badania przeprowadzono na szczurach, u których wywołano sztucznie zawał mięśnia sercowego. Przeszczepione komórki CD34⁺ lokalizowały się w śródserdziu powodując zwiększenie wydajności pracy serca [28].

Badania *in vitro* na komórkach krwi pępowinowej dowiodły również ich wysokiego potencjału do formowania tkanki mięśniowej serca charakteryzującej się prawidłowymi właściwościami mechanicznymi [36].

Wszystkie te prace nie przedstawiły jednak wiarygodnych dowodów na obecność MKM we krwi pępowinowej, ponieważ scharakteryzowały one relatywnie odmienne populacje. Podobnie jak w przypadku linii endodermalnych potrzeba jeszcze wielu dodatkowych badań.

Komórki macierzyste krwi pępowinowej zdolne do różnicowania się w hepatocyty i komórki trzustki

Istnieją już literaturowe doniesienia stwierdzające obecność w szpiku kostnym i krwi obwodowej komórek macierzystych biorących udział w procesie regeneracji wątroby i trzustki [2,27,40]. Jednocześnie Wagers i wsp. [65] pokazali, że hematopoetyczne komórki macierzyste nie mają potencjału różnicowania się wzdłuż niekrwiotwórczych szlaków.

W związku z wciąż rosnącym znaczeniem przeszczepów komórkowych w „terapii regeneracyjnej” różnych tkanek i organów, poszukuje się nowych źródeł komórek macierzystych do tego celu. Wyniki badań Pessina i wsp. [51] po raz pierwszy dają dowód tego, że krew pępowinowa podobnie jak szpik kostny [27] zawiera populację o fenotypie oraz panelu markerów charakterystycznych dla prekursorów komórek trzustki. Hodowla komórek krwi pępowinowej prowadzona była bez udziału jakichkolwiek cytokin i czynników wzrostowych. Komórki krwi pępowinowej wykazujące ekspresję nestyny oprócz tego, że mogą formować neurony, astrocyty i oligodendrocyty [6], mogą także regenerować hematopoezę u myszy po radioterapii [59] oraz prawdopodobnie są również prekursorami komórek wysp trzustkowych (Langerhansa) wydzielających insulinę [51].

Na modelu myszy z niedoborem odporności NOD/SCID (ang. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) pokazano, że krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) krwi pępowinowej CD34⁺CD133⁺c-Kit⁺ mogą migrować do wątroby i formować hepatocyty. Porównywalne wyniki otrzymano zarówno w przypadku obecności, jak i braku uszkodzenia wątroby zwierzęcia - gospodarza. Stwierdzono istotny spadek śmiertelności u myszy z uszkodzoną wątrobą. Na podstawie swoich wyników badacze doszli do wniosku, że ludzkie KKM krwi pępowinowej mają potencjał transdyferencji do hepatocytów, pomimo obserwowanych jakościowych i ilościowych różnic pomiędzy osobnikami [11]. Badania Tanabe i wsp. [64] dały podobne wyniki. Po przeszczepie do wątroby myszy z niedoborem NOD/SCID komórki CD34⁺ krwi pępowinowej różnicowały się w albuminododatnie hepatocyty. Chociaż odnotowana częstość chimeryzmu była dosyć wysoka (75%), to stwierdzono, że również transdyferencjacja rzeczywiście zaszła. Transplantacja ludzkich komórek USSC o fenotypie CD45⁻HLAII⁻ dała zaś bardzo małą liczbę fuzji w czasie integracji do owczej wątroby. Odróżnicowanie się do hepatocytów potwierdzał poziom ludzkiej albuminy w surowicy zwierzęcia [38]. Niską częstość występowania dojrzałych hepatocytów pochodzących od komórek macierzystych z krwi pępowinowej człowieka w mysiej wątrobie, niektórzy autorzy tłumaczą ksenogenicznym charakterem przeszczepu [37].

Również w warunkach *in vitro* udało się otrzymać populację komórek o fenotypie i funkcjach hepatocytów. Hodowla była prowadzona w pożywce z czynnikami wzrostu hepatocytów [37]. Podczas gdy komórki CD34⁺ krwi pępowinowej są uważane za prekursory mogące się różnicować w hepatocyty [11,64], to Kakinuma i wsp. odnotowali negatywny efekt transplantacji wyłącznie komórek CD34⁺. Zaobserwowano, że interakcje pomiędzy populacjami: CD34⁺ i CD34⁻ odgrywają kluczową rolę w procesie różnicowania się i dojrzewania hepatocytów [37].

Problem plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych wciąż budzi wiele kontrowersji. Część badaczy [41] uważa, że owa plastyczność stanowi wyłącznie artefakt związany z występowaniem heterogennej populacji komórek macierzystych o różnym potencjale różnicowania. Obecność antygenu CD34⁺ nie musi oznaczać, że mamy do czynienia z krwiotwórczą komórką macierzystą zarówno w odniesieniu do komórek szpikowych, jak i tych wyizolowanych z krwi obwodowej czy pępowinowej [31]. W związku z tym wyniki takich badań należy traktować ostrożnie, biorąc pod uwagę powyższe fakty.

BANKI KOMÓREK MACIERZYSTYCH KRWI PĘPOWINOWEJ

Od momentu, gdy odniesiono sukcesy w dziedzinie przeszczepiania komórek macierzystych krwi pępowinowej wcześniej zamrożonej i gdy okazało się, że te komórki po rozmrożeniu zachowują swój potencjał proliferacyjny oraz zdolność odtworzenia hematopoezy [56], zbankowano już ponad 130 tysięcy porcji krwi pępowinowej na całym świecie [15].

W Polsce działa już wiele banków krwi pępowinowej. Pacjenci mają prawo wyboru pomiędzy bankiem komercyjnym a bankiem publicznym. Banki publiczne gromadzą porcje krwi pępowinowej dokładnie sklasyfikowane pod względem antygenów HLA do użytku dla przeszczepów allogenicznych. Bank publiczny ponosi wszystkie koszty związane z pobraniem, przebadaniem oraz zamrożeniem komórek macierzystych. Taka porcja krwi trafia do ogólnodostępnego rejestru dawców komórek macierzystych i może zostać wykorzystana przez dowolnego biorcę, który będzie miał odpowiedni stopień zgodności antygenów HLA. Ofertą banków komercyjnych jest zaś pobranie i zbankowanie krwi pępowinowej dla przeszczepu autologicznego lub allogenicznego członkom najbliższej rodziny dawcy. Komercyjne firmy starają się motywować rodziców do podjęcia decyzji o zachowaniu krwi pępowinowej swojego dziecka sugerując możliwość wykorzystania jej w czasie terapii chorób nowotworowych, hematologicznych czy dziedzicznych, jakie mogą dotknąć ich dziecko w przyszłości.

Europejski Komitet Zdrowia przy Radzie Europy [15] popiera bankowanie krwi pępowinowej w celu wykorzystania do transplantacji allogenicznych. Idea banków autologicznej krwi pępowinowej stanowi według opinii Francuskiego Komitetu Konsultacyjnego Do Spraw Etyki [15], wyłącznie merkantylny projekt wykorzystujący troskę rodziców o swoje dzieci, pozwalając wierzyć w nieograniczone lecznicze właściwości komórek macierzystych krwi pępowinowej. Narazanie na tak wysoki koszt

rodziców chcących zamrozić autologiczne komórki macierzyste krwi pępowinowej swojego dziecka zdaniem członków komisji jest nieetyczne, biorąc pod uwagę fakt znikomej przydatności terapeutycznej tych komórek wg obecnego stanu wiedzy. Prawdopodobieństwo użycia autologicznej krwi pępowinowej do przeszczepu zostało oszacowane na 1–20 tysięcy przez pierwsze 20 lat życia dawcy [15]. Do września 2004 roku przeprowadzono 71 zabiegów przeszczepiania komórek macierzystych z użyciem tych zamrożonych w bankach prywatnych [50]. Jednocześnie wzrastająca liczba banków komercyjnych powoduje, że spada liczba potencjalnych allogenicznych porcji krwi pępowinowej, które mogłyby zostać włączone do światowego rejestru [15]. Dodatkowo istnieje ryzyko zakończenia działalności lub bankructwo takiego prywatnego banku. W takich przypadkach, jeśli bank wcześniej nie podjął odpowiednich kroków, to zbankowane porcje krwi ulegną zniszczeniu. Ubezpieczenie powinno klientom gwarantować kontynuację przechowywania ich komórek macierzystych i przeniesienie do innego banku komercyjnego lub wypłatę odszkodowania [15].

Jednakże w sytuacji, gdy istnieje potencjalne ryzyko, że dziecko będzie potrzebowało komórek autologicznych lub rodzinę cechuje rzadki zestaw genów HLA, to rodzice powinni zdecydować się na zbankowanie krwi pępowinowej swojego dziecka w banku prywatnym. Innym argumentem jest wzrastająca wciąż liczba badań prowadzonych nad klinicznym zastosowaniem tych komórek w związku z tym wzrastające prawdopodobieństwo praktycznego ich użycia w terapii „regeneratywnej” w przyszłości. Krew pępowinowa ze względu na swoje właściwości stanowi bowiem lepsze źródło komórek macierzystych niż szpik kostny. Autologiczna, zbankowana krew pępowinowa daje większe szanse na wyleczenie chorób zdiagnozowanych później w ciągu życia [50].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AIREY JA, ALMEIDA-PORADA G, COLLETTI EJ, PORADA CD, CHAMBERLAIN J, MOVSESIAN M, SUTKO JL, ZANJANI ED. Human mesenchymal stem cells from purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 2004; **109**: 1401–1407.
- [2] ALISON MR, POULSOM R, JEFFERY R, DHILLON AP, QUAGLIA A, JACOB J, NOVELLI M, PRENTICE G, WILLIAMSON J, WRIGHT NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; **406**: 257.
- [3] BARKER JN, WEISDORF DJ, DEFOR TE, BLAZAR BR, MCGLAVE PB, MILLER JS, VERFAILLIE CM, WAGNER JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; **105**: 1343–1347.
- [4] BICKNESE AR, GOODWIN HS, QUINN CO, HENDERSON VC, CHIEN SN, WALL DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 2002; **11**: 261–264.
- [5] BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**: 1775–1779.
- [6] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [7] CHEN J, SANBERG PR, LI Y, WANG L. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; **32**: 2682–2688.
- [8] CHOPP M, ZHANG XH, LI Y, WANG L, CHEN J, LU D, LU M, ROSENBLUM M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; **11**: 3001–3005.

- [9] COHEN Y, NAGLER A. Cord blood biology and transplantation. *Isr Med Assoc J* 2004; **6**: 39–46.
- [10] DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; **28**: 875–884.
- [11] Di CAMPLI C, PISCAGLIA AC, PIERELLI L, RUTELLA S, BONANNO G, ALISON MR, MARIOTTI A, VECCHIO FM, NESTOLA M, MONEGO G, MICHETTI F, MANCUSO S, POLA P, LEONE G, GASBARRINI G, GASBARRINI A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Digestive and Liver Disease* 2004; **36**: 603–613.
- [12] D'IPPOLITO G, SCHILLER PC, RICORDI C, ROOS BA, HOWARD GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Bone Miner Res* 1999; **14**: 1115–1122.
- [13] ENDE N, CHEN R. Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med* 2002; **33**: 173–180.
- [14] ERICES A, CONGET P, MINGUELL JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; **109**: 235–242.
- [15] Ethical Aspects of Umbilical Cord Blood Banking. Opinion of The European Group on Ethics in Science and New Technologies to The European Commission. 16th March 2004.
- [16] FLAX JD, AURORA S, YANG C, SIMONIN C, WILLS AM, BILLINGHURST LL, JENDOUBI M, SIDMAN RL, WOLFE JH, KIM SU, SNYDER EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 1033–1034.
- [17] FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; **3**: 393–403.
- [18] GALLACHER L, MURDOCH B, WU DM, KARANU FN, KEENEY M, BHATIA M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; **95**: 2813–2820.
- [19] GANG EJ, HONG SH, JEONG JA, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 102–108.
- [20] GANG EJ, JEONG JA, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; **22**: 617–624.
- [21] GLUCKMAN E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000; **28**: 1197–1205.
- [22] GLUCKMAN E, BROXMEYER HA, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS. 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**: 1174–1178.
- [23] GLUCKMAN E, LOCATELLI F. Umbilical cord blood transplants. *Curr Opin Hematol* 2000; **7**: 353–357.
- [24] GLUCKMAN E, ROCHA V, CHEVRET S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; **5**: 87–99.
- [25] GOODWIN HS, BICKNESE AR, CHIEN SN, BOGUCKI BD, QUINN CO, WALL DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7**: 581–588.
- [26] GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ M, REYES-MALDONADO E, MAYANI H. Characterization of the Adherent Cells Developed in Dexter-Type Long-Term Cultures from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* 2000; **18**: 46–52.
- [27] HESS D, LI L, MARTIN M, SAKANO S, HILL D, STRUTT B, THYSSEN S, GRAY DA, BHATIA M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 763–770.
- [28] HIRATA Y, SATA M, MOTOMURA N, TAKANASHI M, SUEMATSU Y, ONO M, TAKAMOTO S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **327**: 609–614.
- [29] HOGAN CJ, SHPALL EJ, KELLER G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 413–418.
- [30] HOWS JM. Status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. *J Clin Pathol* 2001; **54**: 428–434.
- [31] JANKOWSKI K, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RECA R, ZHAO D, TRZYNA E, TRENT J, PEIPER S, ZEMBALA M, RATAJCZAK J, HOUGHTON P, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003; **63**: 7926–7935.

- [32] JANSEN J, HANKS S, THOMPSON JM, DUGAN MJ, AKARD LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 37–50.
- [33] JAY KE, ROULEAU A, UNDERHILL TM, BHATIA M. Identification of a novel population of human cord blood cells with hematopoietic and chondrocytic potential. *Cell Res* 2004; **14**: 268–282.
- [34] JĘDRZEJCZAK WW, URBANOWSKA E, ROKICKA M, KRÓL M, KRÓL M, TOROSJAN T, TOMASZEWSKA A, PALUSZEWSKA M, GRONKOWSKA A. Wstępna ocena możliwości wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych pozyskanych z różnych dawców krwi pepowinowej do jednoczesnego przeszczepienia u biorców dorosłych. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 139–147.
- [35] JEONG JA, GANG EJ, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004; **15**: 1731–1734.
- [36] KADNER A, HOERSTRUP SP, TRACY J, BREYMANN C, MAURUS CF, MELNITCHOUK S, KADNER G, ZUND G, TURINA M. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg* 2002; **74**: 1422–1428.
- [37] KAKINUMA S, TANAKA Y, CHINZEI R, WATANABE M, SHIMIZU-SAITO K, HARA Y, TERAMOTO K, ARII S, SATO C, TAKASE K, YASUMIZU T, TERAOKA H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; **21**: 217–227.
- [38] KÖGLER G, SENSKEN S, AIREY JA, TRAPP T, MUSCHEN M, FELDHANN N, LIEDTKE S, SORG RV, FISCHER J, ROSENBAUM C, GRESCHAT S, KNIPPER A, BENDER J, DEGISTIRICI O, GAO J, CAPLAN AI, COLLETTI EJ, ALMEIDA-PORADA G, MULLER HW, ZANJANI E, WERNET P. A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med* 2004; **200**: 123–135.
- [39] KONG KY, REN J, KRAUS M, FINKLESTEIN SP, BROWN RH JR. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells* 2004; **22**: 981–993.
- [40] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN RE, ESTROV Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [41] KUCIA M, MAJKA M, RATAJCZAK MZ. Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych: Fakt czy artefakt? *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 139–147.
- [42] LAUGHLIN MJ, BARKER J, BAMBACH B, KOC ON, RIZZIERI DA, WAGNER JE, GERSON SL, LAZARUS HM, CAIRO M, STEVENS CE, RUBINSTEIN P, KURTZBERG J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1815–1822.
- [43] LAUGHLIN MJ, EAPEN M, RUBINSTEIN P, WAGNER JE, ZHANG MJ, CHAMPLIN RE, STEVENS C, BARKER JN, GALE RP, LAZARUS HM, MARKS DI, VAN ROOD JJ, SCARADAVOU A, HOROWITZ MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2265–2275.
- [44] LEE MW, CHOI J, YANG MS, MOON YJ, PARK JS, KIM HC, KIM YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 273–278.
- [45] LEE OK, KUO TK, CHEN WM, LEE KD, HSIEH SL, CHEN TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; **103**: 1669–1675.
- [46] LENDAHL U, ZIMMERMAN LB, MCKAY RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; **60**: 585–595.
- [47] de LIMA M, ST. JOHN LS, WIEDER ED, LEE MS, MCMANNIS J, KARANDISH S, GIRALT S, BERAN M, COURIEL D, KORBLING M, BIBAWI S, CHAMPLIN R, KOMANDURI KV. Double-chimaerism after transplantation of two human leucocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units. *Br J Haematol* 2002; **119**: 773–776.
- [48] MARESCHI K, BIASINI E, PIACIBELLO W, AGLIETTA M, MADON E, FAGIOLI F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; **86**: 1099–1100.
- [49] MCGUCKIN CP, FORRAZ N, ALLOUARD Q, PETTENGELL R. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors *in vitro*. *Exp Cell Res* 2004; **295**: 350–359.
- [50] NIETFELD JJ, VERTER F. Statistics of Autologous Cord Blood Storage and Use. 6th International Cord Blood Society Congress, October 1–3, 2004, Boston, USA.
- [51] PESSINA A, ELETTI B, CROERA C, SAVALLIN, DIODOVICH C, GRIBALDO L. Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **323**: 315–322.

- [52] POJDA Z, MACHAJ EK, GAJKOWSKA A, OŁDAK T, JASTRZEWSKA M. Badanie potencjalnej przydatności klinicznej komórek macierzystych uzyskanych z krwi pępowinowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 127–137.
- [53] REYES M, LUND T, LENVIK T, AGUIAR D, KOODIE L, VERFAILLIE CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; **98**: 2615–2625.
- [54] ROCHA V, CORNISH J, SIEVERS EL, FILIPOVICH A, LOCATELLI F, PETERS C, REMBERGER M, MICHEL G, ARCESE W, DALLORSO S, TIEDEMANN K, BUSCA A, CHAN KW, KATO S, ORTEGA J, VOWELS M, ZANDER A, SOUILLET G, OAKILL A, WOOLFREY A, PAY AL, GREEN A, GARNIER F, IONESCU I, WERNET P, SIRCHIA G, RUBINSTEIN P, CHEVRET S, GLUCKMAN E. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2962–2971.
- [55] ROCHA V, LABOPIN M, SANZ G, ARCESE W, SCHWERDTFEGER R, BOSI A, JACOBSEN N, RUUTU T, DE LIMA M, FINKE J, FRASSONI F, GLUCKMAN E. Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group; Eurocord-Netcord Registry. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2276–2285.
- [56] RUBINSTEIN P. Placental blood-derived hematopoietic stem cells for unrelated bone marrow reconstitution. *J Hematother* 1993; **2**: 207–210.
- [57] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; **164**: 247–256.
- [58] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, KAMATH SG, ZIGOVA T, WILLING A, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORD T, CHOPP M SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [59] SAPORTA S, KIM JJ, WILLING AE, FU ES, DAVIS CD, SANBERG PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 271–278.
- [60] SHIH CC, WENG Y, MAMELAK A, LEBON T, HU MC, FORMAN SJ Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* 2001; **98**: 2412–2422.
- [61] STEC M, JAROCHA D, ZEMBALA M. Optymalizacja metod izolacji i ekspansji komórek CD34⁺ krwi pępowinowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 130–114.
- [62] STORMS RW, GOODELL MA, FISHER A, MULLIGAN RC, SMITH C. Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 2000; **96**: 2125–2133.
- [63] TAGUCHI A, SOMA T, TANAKA H, KANDA T, NISHIMURA H, YOSHIKAWA H, TSUKAMOTO Y, ISO H, FUJIMORI Y, STERN DM, NARITOMI H, MATSUYAMA T. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; **114**: 330–338.
- [64] TANABE Y, TAJIMA F, NAKAMURA Y, SHIBASAKI E, WAKEJIMA M, SHIMOMURA T, MURAI R, MURAWAKI Y, HASHIGUCHI K, KANBE T, SAEKI T, ICHIBA M, YOSHIDA Y, MITSUNARI M, YOSHIDA S, MIAKE J, YAMAMOTO Y, NAGATA N, HARADA T, KURIMASA A, HISATOME I, TERAOKA N, MURAWAKI Y, SHIOTA G. Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 711–718.
- [65] WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002 ; **297**: 2256–2259.
- [66] WAGNER JE, ROSENTHAL J, SWEETMAN R, SHU XO, DAVIES SM, RAMSAY NKC, MCGLAVE PB, SENDER L, CAIRO MS. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996; **88**: 795–802.
- [67] WAGNER JE, BARKER JN, DEFOR TE, BAKER KS, BLAZAR BR, EIDE C, GOLDMAN A, KERSEY J, KRIVIT W, MACMILLAN ML, ORCHARD PJ, PETERS C, WEISDORF DJ, RAMSAY NK, DAVIES SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; **100**: 1611–1618.
- [68] WANG J, KIMURA T, ASADA R, HARADA S, YOKOTA S, KAWAMOTO Y, FUJIMURA Y, TSUJI T, IKEHARA S, SONODA Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assu-red by intra-bone marrow injection. *Blood* 2003; **101**: 2924–2931.

- [69] WEXLER SA, DONALDSON C, DENNING-KENDALL P, RICE C, BRADLEY B, HOWS JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord blood and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; **121**: 368–374.
- [70] WOGNUM AW, EAVES AC, THOMAS TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; **34**: 461–475.
- [71] ZIGOVA T, SONG S, WILLING AE, HUDSON JE, NEWMAN MB, SAPORTA S, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 2002; **11**: 265–274.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 14.03.2005 r.

Przyjęto: 14.04.2005 r.

81-881 Sopot, ul. Kolberga 4c/31,

e-mail: anmys@amg.gda.pl