

VPLIV TKIVNE (NE)SKLADNOSTI PRI TRANSPLANTACIJI KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC IZ POPKOVNIČNE KRVI

Matjaž Jeras

Ključne besede: krvotvorne matične celice; tkivna skladnost; presaditev popkovnične krvi; aloreaktivnost; bolezen presadka proti gostitelju

Key words: hematopoietic stem cells; histocompatibility; cord blood transplantation; alloreactivity; graft versus host disease

Izvleček: V zadnjih nekaj letih je popkovnična kri postala možen in dostopen alternativni vir krvotvornih matičnih celic za alogensko presaditev predvsem tistim bolnikom, ki nimajo niti sorodnih niti nesorodnih tkivno skladnih darovalcev. Med več kot 3500 doslej transplantiranimi bolniki, ki so sledili prvemu objavljenemu primeru iz leta 1989, prevladujejo otroci, poleg njih pa je tovrstne presadke prejelo že tudi več kot 500 odraslih. Naivnost limfocitov T iz popkovnične krvi omogoča, da lahko presajamo neonatalne krvotvorne matične celice z 1 (5/6) ali 2 (4/6) neujemanjema v antigenih ali alelih HLA z enako stopnjo tveganja za nastanek bolezni presadka zoper gostitelja kot v primeru uporabe tkivno skladnih presadkov odraslih nesorodnih darovalcev. Poglavitna pomanjkljivost popkovnične krvi pa je v tem, da vsebuje malo matičnih celic, zaradi česar je več primerov neuspešne presaditve oziroma težav zaradi zapoznelega prijettja presadka v primerjavi s presaditvijo alogenskega kostnega mozga. Možen pristop za izboljšanje te omejitve predstavljajo danes različni načini gojenja oziroma ekspanzije predhodnikov krvotvornih matičnih celic v pogojih *in vitro*. S tem in pa s sočasno uporabo dveh različnih enot popkovnične krvi postaja presajanje neonatalnih krvotvornih matičnih celic vse bolj zanimivo tudi za odrasle bolnike.

Abstract: In recent years, umbilical cord blood (UCB) has emerged as a possible and feasible alternative source of hematopoietic stem cells (HSC) for allogeneic transplantation, mainly in patients who lack HLA-matched related and unrelated donors. Among more than 3500 transplanted patients since the first reported case in 1989, the vast majority of recipients are children. However, up to now, more than 500 UCB transplantations were performed in adults as well. The naive state of UCB lymphocytes T permits the use of grafts with 1 (5/6) or 2 (4/6) HLA antigen or allele mismatches with the same risk of generating graft versus host disease as in the case of HLA compatible allogeneic bone marrow transplantation. The main disadvantage of UCB is, that it contains low numbers of stem cells, resulting in higher rates of graft failure as well as problems related to delayed time to engraftment as compared to allogeneic bone marrow transplantation. A possible approach to overcome this important limitation involves different ways of *in vitro* cultivation and expansion of UCB derived hematopoietic stem cell precursors. Nowadays this kind of HSC enrichment and a concomitant use of two different UCB units have made the UCB transplantation more and more accessible to adult patients as well.

Uvod

Prvo uspešno presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC) popkovnične krvi (PK) so opravili leta 1988 v Parizu. Prejemnik PK svoje tkivno skladne sestrice je bil šestletni deček s Fanconijevo anemijo (1). Leta 1996 je dr. Pablo Rubinstein s sodelavci (New York Blood Center) objavil obetavne rezultate prvih 25 primerov presaditev nesorodnih v tkivnih antigenih HLA (Human Leukocyte Antigens) delno neskladnih enot PK, ki so jih hranili v kriobanki (2). Presaditve so opravili v letih 1993 – 1995, prejemniki pa so bili otroci, od katerih jih je zdravljenje preživelo 12 (48 %). Enajst od teh jih živi še danes, so zdravi in vsak ima popoln darovalčev himerizem (3).

Že v prvih študijah so ugotovili, da nesorodna alogenska PK v prejemnikih povzroča manj akutnih in kroničnih oblik bolezni presadka zoper gostitelja – GvHD (Graft versus Host Disease) v primerjavi s transplantacijami KMC odraslih nesorodnih darovalcev, ki so bili v tkivnih antigenih HLA celo bistveno skladnejši s transplantiranimi bolniki. Prav tako so prišli tudi do spoznanja, da količina celic z jedrom v PK odločilno vpliva tako na prijetje presadka kakor tudi na celokupno preživetje transplantiranih bolnikov.

Ker je v presajeni PK število KMC omejeno, so dolgo časa menili, da bo tovrstna transplantacija primerna izključno za otroke. Razmeroma dolgo je bilo zato navdušenje za uporabo PK pri odraslih bolnikih precej majhno, še posebej zaradi dejstva, ker so bile prve takšne presaditve, ki so jih izvedli v ZDA, precej neuspešne (4). Delno je bila za slab rezultat kriva izbira bolnikov, ki so bili vsi v terminalnem obdobju bolezni, delno pa uporabljena količina celic z jedrom, ki je bila v povprečju manjša od 2×10^7 / kg telesne teže. Veliko bolje so potekale tiste presaditve PK odraslim bolnikom, pri katerih so uporabili večje koncentracije celic z jedrom, npr. v študiji Ooiya in sodelavcev, več kot $2,43 \times 10^7$ / kg telesne teže (5). Od prvega poročila o tovrstni transplantaciji, leta 1996, so v svetu opravili že več kot 500 presaditev PK odraslim bolnikom (6, 7). Danes so za potrebe transplantacije nesorodnih KMC iz PK odraslim bolnikom na voljo različni, večinoma še vedno eksperimentalni pristopi, s katerimi lahko povečajo število infundiranih matičnih celic oziroma izboljšajo prijetje presadka, na primer: sočasna uporaba enot PK dveh različnih, glede tkivne skladnosti sprejemljivih in primerljivih (antigeni oziroma aleli HLA) nesorodnih darovalcev, uporaba prej *ex vivo* namnoženih KMC iz PK ter sočasna uporaba mezenhimskih matičnih celic (MMC) in PK (7, 8).

Pri uporabi dveh enot PK različnih nesorodnih darovalcev so ugotovili, da po določenem času v prejemniku vedno popolnoma prevlada le ena od njiju. Na to, katera bo ta, pa ne vplivajo niti število celic z jedrom, niti število $CD34^+$ KMC, niti stopnja ujemanja v antigenih HLA, pač pa izključno velikost populacije $CD3^+$ limfocitov T v posamezni enoti PK (8, 9).

Na področju *ex vivo* gojenja in ekspanzije KMC, izoliranih iz PK, obstaja vrsta eksperimentalnih pristopov, pri katerih uporabljajo definirane medije, ki vsebujejo različne kombinacije in koncentracije določenih topnih rastnih dejavnikov, npr.: eritropoietina, dejavnika matičnih celic, G-CSF (granulocitne kolonije stimulirajočega dejavnika), MGDF (magakariocitnega rastnega in razvojnega dejavnika) in liganda Flt-3 (trimer CD40-L) (7, 8, 10, 11, 12). Nadaljnji razvoj pa je usmerjen v uporabo mezenhimskih matičnih celic kot podporne strome za *ex vivo* ekspanzijo zarodnih mononuklearnih celic iz PK (8). Takšen način gojenja KMC iz PK namreč pospešuje njihovo proliferacijo, ob sočasni ustavitvi njihovega dozorevanja (7). Zanimiv eksperimentalni model je tudi gojenje KMC, izoliranih iz PK v mediju, ki vsebuje Kit-ligand, Flt-3, IL-6, trombopoietin, IL-3 ter kelator bakrovih ionov tetraetilenpentin (TEPA). Slednji znižuje znotrajcelično koncentracijo bakra, kar vodi v ustaveitev dozorevanja KMC, ne

da bi bila pri tem okrnjena njihova sposobnost za tvorbo kolonij (7). Znano je namreč, da igrajo bakrovi ioni pomembno vlogo v uravnavanju hematopoieze.

Čimboljše ujemanje v antigenih oziroma alelih HLA med darovalcem in prejemnikom KMC odločilno vpliva na uspešnost transplantacije. To vsekakor velja tudi za presajanje PK. Ker pa je zaradi silne raznolikosti antigenov HLA razredov I in II med nesorodniki izredno težko najti tkivno povsem skladnega darovalca za posameznega bolnika, je dejstvo, da lahko uspešno presadimo tudi takšno PK, ki se v tkivnih antigenih ne ujema povsem s prejemnikom, izjemno pomembno. Kakšni so torej možni razlogi in najverjetnejši mehanizmi za očitno manjšo imunogenost in šibkejšo aloreaktivnost PK v primerjavi s kostnim mozgom oziroma periferno zbranimi KMC odraslih nesorodnih oseb?

Bolezen presadka zoper gostitelja (GvHD)

Akutna in kronična bolezen presadka zoper gostitelja sta pglavitni toksični spremljevalki presaditve alogenskih KMC. Bolnik, prejemnik presadka, je zaradi svoje bolezni, dotedanjih okužb ter postopka kondicioniranja precej poškodovan, kar se kaže v obsežnih provnetnih spremembah njegovih endotelijskih in epiteljskih celic (13, 14). Te spremembe, med katere štejemo: povečano izražanje adhezijskih in drugih molekul, npr. HLA razredov I in II, na celičnih površinah ter seveda različnih citokinov, poleg samega alogenskega okolja, v katerem se znajdejo infundirane celice darovalca, povzročijo, da se posledično zlahka aktivirajo in namnožijo darovalčeve vnetne aloimunske celice. To pa je proces, ki je zelo podobno mehanizmu celičnega imunskega odziva na okužbo z virusi ali s po gramu negativnimi bakterijami. Tudi osnovne tarče njihovega napada v prejemniku: koža, črevesje in jetra, kažejo na sorodnost med okužbo in GvHD, saj so vsi omenjeni organi stalno izpostavljeni endotoksinom in drugim bakterijskim proizvodom, ki lahko sprožijo in okrepijo lokalne vnetne procese (14). Ker gre za področja, ki predstavljajo prvo obrambno linijo telesa pred okužbami, je v njih veliko profesionalnih antigenov predstavljajočih celic (APC), zlasti dendritičnih celic (DC) in makrofagov, ki vzbudijo in vzpodbujajo potek GvHD (14, 15). Poleg efektorskih imunskih celic (celice T pomagalk in citotoksični limfociti T) k začetku in poteku akutnega GvHD pomembno prispeva tudi pretirana količina sproščenih citokinov (citokinska nevihta), osrednjih regulacijskih molekul v imunskem sistemu (14). Sicer pa zaenkrat ne znamo pojasniti, zakaj GvHD ne poškoduje npr. ledvičnih vodov, živčnega tkiva, mišic, žil, kosti in hrustanca. Na omejeno prisotnost GvHD v telesu lahko vsekakor vpliva specifično potovanje in zadrževanje (homing) limfocitov v omenjenih tkivih oziroma organih (15).

V zadnjem času se veliko raziskav usmerja v preučevanje funkcije naravnih celic ubijalk (NK). Le-te same ne morejo izzvati nastanka GvHD. Darovalčeve naravne celice ubijalke pa lahko prispevajo k uničevanju tarčnih celic prejemnika, in sicer zaradi povečanega izražanja celičnih površinskih molekul pod vplivom GvHD, ki nato aktivirajo celice NK z vezavo na njihove aktivacijske receptorje NKG2D. Dokazali so, da pride po transfuziji aloreaktivnih celic NK v nekaj urah do uničenja prejemnikovih limfocitov, mieloidnih celic in APC (15). Ker so za nastanek bolezni presadka zoper gostitelja nujno potrebne APC, bi uporaba aloreaktivnih celic NK lahko bistveno zmanjšala njen obseg in intenzivnost. Objavljeni klinični podatki potrjujejo to hipotezo, saj so pri sorodni haploidni ter nesorodni transplantaciji KMC opazili mnogo manj GvHD v primeru NK aloreaktivnih dvojic darovalec-prejemnik kot pa v primerih, ko so bile le-te kompatibilne v receptorjih KIR (Killer Cell Immunoglobulin Receptors ali Killer Inhibitory Receptors) naravnih celic ubijalk (15). Ligandi receptorjev KIR, ki so lahko inhibicijski ali aktivacijski, so molekule HLA razreda I, zlasti Cw in B, pa tudi A (16).

Sočasno z GvHD poteka tudi želeni del celične aloreaktivnosti, in sicer delovanje presadka zoper levkemijo ali GvL (Graft versus Leukemia). Izvajalci GvL so efektorski limfociti T ter aloreaktivne celice NK. Prejemnikovi levkemični antigeni, ki jih predstavljajo rakave celice, lahko aktivirajo specifične klone darovalčevih limfocitov T. Takšne klone nato lahko namnožimo *in vitro* ter jih uporabimo za zdravljenje levkemije *in vivo* (prenos adoptivne imunosti). Vprašanje pa je, ali je neposredno predstavljanje levkemičnih antigenov na rakavih celicah edini možni mehanizem za nastanek darovalčevega protitumorskega celičnega imunskega odziva, saj lahko na ta način največkrat pride le do anergije (neodzivnosti) ali celo do apoptoze odzivnih klonov limfocitov T, kar je posledica pomanjkanja ali popolne odsotnosti kostimulativnih molekul na levkemičnih celicah, ki seveda niso profesionalne APC. Zaenkrat ni nobenega neposrednega dokaza, da pri ljudeh darovalčeve ali prejemnikove DC posredno predstavljajo darovalčevim limfocitom T, v peptide razgrajene levkemične antigene, vezane na molekule HLA (15). Zaradi tega dejstva ter številnih drugih odprtih vprašanj danes še vedno ne znamo v celoti pojasniti fenomena GvL. Poleg tega obstajajo velike razlike v dojemljivosti za pozitivne vplive GvL med posameznimi hematološkimi malignimi boleznimi, kar je posledica različnosti tako v sposobnostih stimuliranja antilevkemičnih limfocitov T ($CD4^+$ in $CD8^+$) kakor tudi v odpornosti rakavih celic na njihov napad (15).

Ker so hematopoietske celice zelo dobre tarče napada celic NK, ni prav nič nenavadno, da pride po srečanju le-teh s KIR-nekompatibilnimi (antigeni HLA razreda I) levkemičnimi celicami do močne citotoksične reakcije, ki je ne moremo nikoli doseči v primeru HLA skladnih ali avtolognih rakavih celic. Klinični pomen neujemanj v receptorjih in ligandih celic NK se najboljše kaže v izredno nizki incidenci ponovnega izbruha bolezni pri bolnikih z AML (akutna mieloična levkemija), ki so prejeli haploidetične ali nesorodne presadke, iz katerih so odstranili limfocite T (15).

Eno od trenutno najpomembnejših vprašanj je, ali je možno ločiti GvL od GvHD in sicer kako? Morda bo to uspelo s selektivnim odstranjevanjem tistih klonov limfocitov T, ki so odgovorni za GvHD, ali pa tako, da bomo lahko pripravljali in dodajali takšne regulacijske celice, ki aktivno preprečujejo nastanek GvHD (npr. $Th2/Tc2$, $CD4^+CD25^+$) (15). Prav tako veliko obeta uporaba aloreaktivnih celic NK izbranih tretjih oseb, ki lahko izvajajo GvL brez nastanka GvHD. Razmeroma kmalu pa bo morda možna tudi blokada inhibicijskih receptorjev celic NK *in vivo*, ki ne bo dobrodošla le pri izboljšanju imunske terapije levkemij, ampak tudi imunske odzivnosti na virusne okužbe (16).

Vplivi tkivne (ne)skladnosti na uspešnost presaditve PK

Tkivni antigeni HLA razredov I in II so ključnega pomena za prepoznavanje lastnega in tujega v imunskem sistemu in so izredno polimorfni. Med prve sodijo molekule HLA-A, -B in -C, med druge pa molekule HLA-DR, -DQ in -DP. Molekule HLA razreda I so zgrajene iz transmembranske verige α in z njo nekovalentno povezanega $\beta 2$ -mikroglobulina, molekule razreda II pa iz dveh, med seboj nekovalentno povezanih transmembranskih verig α (A) in β (B). Prve najdemo na vseh telesnih celicah z jedrom in trombocitih, druge pa na APC (limfociti B, monociti / makrofagi, dendritične celice), na aktiviranih limfocitih T ter na nekaterih endotelijskih celicah. Od svojih staršev vsakdo podeduje po en set ali haplotip antigenov HLA. Če torej preštejemo antigene HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in -DP, jih ima vsak posameznik 12. Razsežnosti njihove raznolikosti smo lahko spoznali šele potem, ko so nam postale dostopne različne tehnike tipizacije DNK na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Te omogočajo dose-

ganje ravni visoke ločljivosti. Danes je, v skladu z nomenklaturu SZO (določa WHO Committee for Factors of the HLA System) uradno priznanih 338 alelov HLA-A, 617 HLA-B, 179 HLA-C, 3 HLA-DRA, 463 HLA-DRB, 28 HLA-DQA1 in 59 HLA-DQB1, 22 HLA-DPA1 in 111 HLA-DPB1. Njihove nukleotidne in aminokislinske sekvence so zbrane v splošno dostopni podatkovni bazi IMGT/HLA (17). V tabeli 1 je prikazan osnovni princip označevanja v skladu z uradno nomenklaturu HLA (17):

Poimenovanje	Označuje
HLA	Področje HLA in predpono za posamezen gen HLA.
HLA-DRB1	Določen lokus HLA, v tem primeru DRB1.
HLA-DRB1*13	Skupino alelov, ki kodirajo antigen HLA-DR13.
HLA-DRB1*1301	Specifični alel.
HLA-DRB1*1301N	Nični oziroma neizraženi alel.
HLA-DRB1*130102	Alel, ki se razlikuje v sinonimni mutaciji (kodira isto ak).
HLA-DRB1*13010102	Alel, ki vsebuje mutacijo zunaj kodirajočega področja.
HLA-DRB1*13010102N	Nični alel, ki vsebuje mutacijo zunaj kodirajočega področja.

Ker lahko v okviru najožje družine najdemo genotipsko skladne osebe (brate, sestre) le za nekaj več kot 25 % bolnikov, moramo zanje pogosto iskati ustrezne, tkivno skladne nesorodne darovalce med odraslimi člani nacionalnih registrov ali pa med enotami popkovnične krvi, shranjenih v posebnih bankah. Podatki o njihovih fenotipih HLA so na razpolago v svetovnem registru BMDW (Bone Marrow Donors Worldwide).

Glede na to, da so izvajali presaditve KMC nesorodnih oseb tudi v obdobjih, ko določitev alelov, genskih zapisov za polimorfne dele molekul HLA še niso bile možne, je bilo veliko presaditev narejenih z, do različne stopnje, tkivno neskladnimi darovalci. Zato je bila tudi njihova uspešnost razmeroma skromna. Še ne dolgo tega so tkivno skladnost v antigenih HLA razreda I med darovalcem in bolnikom usklajevali na ravni serološke tipizacije (uporaba specifičnih monoklonskih in poliklonskih protiteles anti-HLA). Danes pa akreditacijski standardi Evropske federacije za imunogenetiko EFI in Ameriške zveze za histokompatibilnost in imunogenetiko ASHI za izvajanje programa nesorodne transplantacije KMC obvezno zahtevajo tipizacijo DNK visoke ločljivosti, kar pomeni določanje alelskih specifičnosti antigenov HLA razreda II ter poleg serološke tudi tipizacijo DNK nizke in visoke ločljivosti za antigene HLA razreda I. Pri določanju tkivne skladnosti za transplantacijo KMC je seveda vedno ključno vprašanje, kakšna so najustreznejša merila za izbiro darovalcev. Pri tem mislimo tako na stopnjo ločljivosti tipizacije (nizka in visoka) kakor tudi na stopnjo ujemanja (antigen-ska ali alelska) ter tudi na to, v katerih lokusih HLA je lahko prisotno morebitno neujemanje. Vsi omenjeni dejavniki namreč pomembno vplivajo na uspešnost presaditve. To je še zlasti aktualno pri transplantaciji PK, pri kateri si, glede na podatke iz literature, lahko privoščimo več neujemanje kot pri presaditvi KMC odraslih nesorodnih darovalcev. Poleg same tipizacije visoke ločljivosti pa so nam lahko pri funkcijskem vrednotenju imunogenosti posameznih neujemanj v antigenih oziroma alelih HLA razreda I v pomoč tudi določene tehnike *in vitro*, npr. določanje predhodnikov citotoksičnih limfocitov T.

V tabeli 2 je prikazan primer stopenjske tipizacije, od serološke določitve nadskupine, preko serološke določitve podskupine antigena HLA, nato potrditvenih izsledkov tipizacije na ravni DNK z nizko in končno še z visoko stopnjo ločljivosti (določitev alelske specifičnosti):

Raven tipizacije	Primer
Nadskupina antigena HLA (serologija)	A9
Podskupina antigena HLA (serologija)	A23
Alelska skupina (DNK, nizka ločljivost)	A*23
Specifični alel	A*2301

Kaj pomeni antigensko in kaj alelsko ujemanje oziroma neujemanje, pa nam prikazuje tabela 3:

Izraz	Stopnja ujemanja	Primeri	
		Darovalec	Prejemnik
Ujemanje	na ravni antigena (serološka tipizacija)	HLA-A2	HLA-A2
	ujemanje na ravni tipizacije DNK z nizko resolucijo	HLA-A*02	HLA-A*02
	na ravni alela	HLA-A*0201	HLA-A*0201
Alelsko neujemanje	antigensko ujemanje (serološka tipizacija)	HLA-A2	HLA-A2
	ujemanje na ravni tipizacije DNK z nizko resolucijo	HLA-A*02	HLA-A*02
	alelsko neujemanje	HLA-A*0201	HLA-A*0205
Antigensko neujemanje	antigensko neujemanje	HLA-A2	HLA-A1
	neujemanje na ravni tipizacije DNK z nizko resolucijo	HLA-A2*02	HLA-A*01
	alelsko neujemanje	HLA-A*0201	HLA-A*0101

Izredno pomembne in dragocene so študije večjih skupin transplantiranih bolnikov, v katerih s pomočjo multivariantnih statističnih pristopov vrednotijo vplive posameznih neujemanj na pojav in stopnjo GvHD ter na preživetje. Takšne raziskave lahko izvajajo samo veliki nacionalni registri in transplantacijski centri ali pa več nacionalnih registrov in centrov skupaj. Njihovi izsledki predstavljajo splošno priznano strategijo za izbiro najustrežnejšega darovalca za posameznega bolnika (18, 19, 20). Dolgo časa že velja, da je minimalno ujemanje 5/6, kar pomeni največ eno neujemanje v antigenih HLA-A, -B (antigenska raven) in -DRB1 (alelska raven). Danes pa prevladuje mnenje, da pomeni odlično ujemanje skladnost med darovalcem in bolnikom v alelih HLA-A, -B, -C in DRB1 (8/8) (19, 20). V študijah so namreč ugotovili, da je v povprečju antigensko neujemanje bolj nevarno od alelskega, seveda znotraj posamezne skupine alelov, in da neujemanja v HLA-DQ in -DP ne vplivajo statistično značilno na potek presaditve, razen če niso poleg njih prisotna še kaka druga neujemanja (19, 20). V Centru za tipizacijo tkiv dokončno izberemo dvojice bolnik – nesorodni darovalec na osnovi tipizacije DNK na visoki ravni ločljivosti, in sicer HLA-A, -B, -C, -DRB1 in -DQB1. V primeru več enakovrednih darovalcev pa se včasih odločimo za najustrežnejšega tudi ob upoštevanju ujemanja v alelih HLA-DPB1. Poleg tkivnih antigenov nam lahko služijo za izbiro najustrežnejšega med več možnimi nesorodnimi darovalci tudi naslednji dejavniki: starost, negativen izvid določitve statusa CMV, ujemanje v krvni skupini, spol (moški), odsotnost alosenzibilizacije, večja telesna masa ter darovalčeva dostopnost.

V številnih študijah, ki so primerjale potek in uspeh transplantacij PK in kostnega mozga odraslih nesorodnih oseb, so ugotovili, da je frekvenca nastanka akutne in kronične GvHD po presaditvi HLA-A, -B (antigensko ujemanje) in DRB1 (alelsko ujemanje) skladnega (6/6) transplantata odraslih nesorodnih KMC povsem primerljiva s tisto po uporabi PK z enim (5/6) ali dvema (4/6) neujemanjima v omenjenih tkivnih antigenih (21, 22). Ugotovili so tudi, da pride sicer po presaditvi PK do bistveno večje umrljivosti, ki je povezana s transplantacijo - TRM (Transplant Related Mortality), da pa je celokupno preživetje pediatričnih bolnikov nato povsem primerljivo s tistim po presaditvi tkivno

skladnega kostnega mozga odraslih nesorodnih darovalcev (21, 22).

Poleg vsega naštetega je seveda uporaba PK ugodna tudi zato, ker lahko hitro identificiramo ustrezno enoto ter tako izvedemo transplantacijo bistveno prej kot v primeru odraslih nesorodnih darovalcev KMC.

Aloreaktivnost PK v primerjavi s presadki KMC odraslih nesorodnih darovalcev

Ker po alogenski transplantaciji PK nastane statistično značilno manj resnih oblik GvHD v primerjavi s presaditvijo KMC odraslih nesorodnih darovalcev, to pripisujejo predvsem nezrelosti imunskega sistema novorojencev oziroma naivnosti limfocitov T v PK.

Med drugim so namreč ugotovili, da je v PK prisotnih bistveno več CD45RA⁺ (naivne) in bistveno manj CD45RO⁺ (spominske) celic T pomagalk kot v periferni krvi odraslih oseb, medtem ko so v obeh vrstah vzorcev našli enako število regulatornih CD4⁺CD25⁺ limfocitov T (23). Ker GvHD nastane zaradi direktnega prepoznavanja aloantigenov (molekul HLA) na prejemnikovih APC, so, z namenom, da bi raziskali in pojasnili mehanizme manjše aloreaktivnosti in imunogenosti popokovnične krvi, primerjali aloimunske odzivnosti celic T pomagalk (CD4⁺) izoliranih iz sveže odvzetih PK ter tistih, ki so jih osamili iz vzorcev periferne krvi odraslih oseb. V pogojih *in vitro* so jih inkubirali skupaj z nezrelimi in na različne načine dozorelimi (BCG in LPS) dendritičnimi celicami (DC), pripravljenimi iz monocitov odraslih oseb. Celice T pomagalk iz PK so po stiku z nezrelimi in s pomočjo mikobakterij BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) dozorelimi DC proizvajale statistično značilno manj interferona γ (IFN- γ) ter več interleukina 10 (IL-10) v primerjavi z limfociti CD4⁺ odraslih oseb (23). Podoben citokinski profil je značilen za regulacijske limfocite T (Tr1), ki proizvajajo velike količine IL-10, zmerne TGF- β (Transforming Growth Factor - β), IFN- γ in IL-5 ter majhne količine IL-2, ne izločajo pa IL-4. Takšne celice zavirajo imunske odzive tako *in vitro* kot *in vivo*. Sicer pa je IL-10 citokin, ki ima najmočnejše protivnetno delovanje, saj zavira tvorbo proinflammatoryh IL-1, IL-6 in TNF- α , ki vsi prispevajo k razvoju GvHD. Ko so nato za alogensko stimulacijo uporabili z LPS (bakterijski lipopolisaharid) dozorele DC, so dosegli učinkovite proinflammatorye aloimunske odzive vrste Th1, in sicer tako celic T pomagalk iz PK kakor tudi tistih iz periferne krvi odraslih oseb (23). Sicer pa so dokazali, da je LPS vpleten v patogenezo GvHD in je skupaj s svojim poglavitnim receptorjem TLR4 (Toll-Like Receptor 4) povezan s tveganjem za nastanek bolezni presadka zoper gostitelja (23). Zanimivo je tudi delovanje G-CSF (granulocitne kolonije vspodbujajoči dejavnik), saj vzpostavi prevladujoči citokinski profil vrste Th2 v darovalčevih DC. Zato ni nobeno presenečenje, da po presaditvi KMC, ki jih zberejo po stimulaciji darovalca z G-CSF, ne pride do prevladujočega pojavljanja akutne bolezni presadka zoper gostitelja (23). Manjše količine nastalega IFN- γ in višje IL-10 v CD4⁺ limfocitih T iz PK, ki so jih izmerili po njihovem draženju z alogenskimi nezrelimi in z BCG dozorelimi DC odraslih oseb, bi lahko bile vzročno povezane z redkejšim nastajanjem GvHD po presaditvi PK. S klinično uporabo nezrelih DC, ki izzovejo nastanek regulacijskih celic Tr1 ter z dodatnim preprečevanjem dozorevanja prejemnikovih DC *in vivo* (odsotnost LPS oziroma okužb s po gramu negativnimi bakterijami), bi torej lahko pomembno zmanjšali možnosti za nastanek GvHD.

Interakcija med receptorjem CD40, ki je prisoten na APC, in njegovim ligandom CD40L je kostimulacijski aktivacijski signal. Pomembna je za uravnavanje celičnega imunskega odziva. V pogojih *in vitro* so ugotavljali vlogo vezave CD40L (uporabili so njegov trimer Lt3) na receptorje CD40, izražene na limfo-

citih B in monocitih, izoliranih iz PK in periferne krvi odraslih oseb. Nezrelost neonatalnega kostimulacijskega vezavnega para CD40-CD40L so ugotovili le v primeru celičnega imunskega odziva, v katerem so kot APC uporabili monocite iz PK (24). Tudi IFN- γ ni aktiviral njihovega odziva na CD40L, tako kot pri monocitih iz periferne krvi odraslih oseb (povečano izražanje receptorja CD40 na njihovi površini). To pa pomeni, da v vnetnem mikrokolju v prejemniku po presaditvi PK, neonatalni monociti ne igrajo bistvene vloge v efektorskem delu aloimunskega odziva, kar lahko predstavlja enega od številnih vzrokov za razmeroma majhno pojavnost GvHD po tovrstnem zdravljenju.

Med drugim so v številnih študijah *in vitro* dokazali tudi pomembno disregulacijo ekspresije citokinskih genov, nastajanja proteinov ter funkcijskih aktivnosti aktiviranih mononuklearnih celic (MNC), zlasti monocitov iz PK, v primerjavi s tistimi iz periferne krvi odraslih oseb, kar zopet kaže na določeno stopnjo nezrelosti neonatalnega imunskega sistema (25).

Proteinska ekspresija NFATc2 (jedrni dejavnik aktiviranih limfocitov T, c2) kritičnega, nujno potrebnega transkripcijskega dejavnika za povečano izražanje številnih citokinov, ki izrazito ojačijo alogenske odzive limfocitov T, je zmanjšana v omenjenih celicah iz PK v primerjavi z limfociti T odraslih oseb. Zmanjšana celokupna izraženost z NFAT tesno povezanih genov kakor tudi samih citokinov in kemokinov v limfocitih T iz PK bi lahko prispevala k manjši incidenci GvHD po presaditvi PK (26).

Specializirana mikropodročja celične membrane, t.i. lipidni splavi (lipid rafts), igrajo ključno vlogo v aktivacijski signalizaciji limfocitov T. Molekula CD26 ima aktivnost dipeptidil peptidaze IV, veže adenozijsko deaminazo in aktivira limfocite T, zato je primerna za študij aktiviranja limfocitov T ter vloge omenjenih lipidnih splavov pri prenosu aktivacijskih signalov. Ugotovili so različne ravni izražanja molekul CD26 na limfocitih T iz PK v primerjavi z limfociti T iz periferne krvi odraslih oseb. Prav tako so opazili razlike med CD26⁺CD45RA⁺ limfociti T iz obeh omenjenih virov (27). Molekule CD26 se na limfocitih T iz PK povezujejo s CD45RA zunaj lipidnih splavov. To pa bi lahko bil vzrok za oslabljeno aktivacijsko signaliziranje preko CD26, s tem pa tudi za nezreli imunski odziv in nizko pojavnost hudih oblik GvHD po presaditvi PK (27).

Na PK lahko vplivamo imunomodulacijsko z načinom njene krioprezervacije. Različne hitrosti zamrzovanja: 1, 5, 7,5 in 10 °C na minuto namreč različno prizadenejo alostimulacijsko in aloproliferacijsko funkcijo ter klonogeni potencial PK (28). Čeprav se je klonogeni potencial PK s povečevanjem hitrosti zamrzovanja zmanjševal, pa s pomočjo pretočne citometrije niso zaznali sprememb v odstotkih CD34⁺ KMC in limfocitov. Ugotovili so, da hitrosti zamrzovanja med 1 in 5 °C na minuto statistično značilno zmanjšajo proliferacijsko sposobnost MNC iz PK ter tako lahko delujejo imunomodulacijsko, pri čemer pa ostane funkcija KMC povsem neokrnjena (28).

Zaključek

Hitrost identifikacije in presaditve ustrezne enote PK, manj stroge zahteve glede tkivne skladnosti med darovalcem in prejemnikom presadka ter zelo redko prisotna virusna kontaminacija PK (CMV, EBV), so odlike, ki postavljajo popkovnično kri kot vir KMC pred kostni mozeg ali periferno zbrane KMC odraslih nesorodnih oseb. Ta ugotovitev velja seveda predvsem za pediatrične bolnike. Novi pristopi za uporabo PK s sočasno uporabo dveh enot ter z možnostjo ekspanzije KMC *ex vivo* pa odpirajo nove perspektive za tovrstni način zdravljenja tudi pri odraslih bolnikih z levkemijo. Popkovnična kri postaja torej poleg odraslih nesorodnih darovalcev vse pomembnejši vir KMC.

LITERATURA

1. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174–8.
2. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335(18): 157–66.
3. Kurtzberg J. Progress with unrelated cord blood transplants in adults. *Blood* 2003; 101: 4648.
4. Laughlin MJ, Barker, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; 344(24): 1815–22.
5. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. A clinical comparison of unrelated cord blood transplantation and unrelated bone marrow transplantation for adult patients with acute leukaemia in complete remission. *J Haematol* 2002; 118: 140–3.
6. Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P, et al. Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1996; 335 (18): 167–70.
7. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation – how, when and for whom? *Blood Reviews* 2004; 18: 167–79.
8. Symposium Summary. Second Annual International Umbilical Cord Blood Symposium. Los Angeles, California, May 14-15, 2004. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2004; 10: 728–39.
9. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of two partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. Prepublished October 5, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-07-2717.
10. McNiece IK. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 2004; 32(5): 409–10.
11. McNiece IK. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. Part II: control of proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells *Experimental Hematology* 2004; 32(8): 692.
12. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2002; 8: 368–76.
13. Ferrara JLM, Cooke RK, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 1996; 14(5): 473–89.
14. Ferrara JLM, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-versus-host-disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999; 5: 347–56.
15. Barret AJ, Rezvani K, Solomon S, et al. New developments in allotransplant immunology. *Hematology* 2003; 350–71.
16. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 100: 1935–47.
17. Robinson J, Waller MJ, Parham P, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acid Research* 2003; 31: 311–14.
18. Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, et al. Major-histocompatibility –complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2001; 345(25): 1794–800.
19. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004; 104(7): 1923–30.
20. Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2004; 104(9): 2976–80.
21. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood. *Blood* 2003; 101(11): 4233–44.
22. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33: 605–11.
23. Liu E, Law HKW and Lau Y-L. Tolerance associated with cord blood transplantation may depend on the state of host dendritic cells. *British Journal of Hematology* 2004; 126: 517–26.
24. Han P, McDonald T, Hodge G. Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology* 2004; 113: 26–34.
25. Jiang H, Van de Ven C, Satwani P, et al. Differential gene expression patterns by oligonucleotide microarray of basal versus lipopolysaccharide-activated monocytes from cord blood versus adult peripheral blood. *J Immunol* 2004; 172: 5870–79.
26. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, et al. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4⁺ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood* 2003; 102(13): 4608–17.
27. Kobayashi S, Ohnuma KI, Uchiyama M, et al. Association of CD26 with CD45RA outside lipid rafts attenuates cord blood T-cell activation. *Blood* 2004; 103(3): 1002–10.
28. Ketheesan N, Whiteman C, Malczewski AB, et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells. *Transfusion and Apheresis Science* 2004; 30: 47–54.