

# Krew pępowinowa. Przeszłość, teraźniejszość, przyszłość

## Cord blood. The past, the present and the future

© GinPolMedProject 4 (14) 2009

Artykuł poglądowy/Review article

---

DARIUSZ BORUCZKOWSKI

NZOZ – Polski Bank Komórek Macierzystych SA

---

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Dariusz Boruckowski

NZOZ – Polski Bank Komórek Macierzystych SA

ul. Grzybowska 2/41, 00-131 Warszawa

Tel./fax: +48 22 436 40 49, +48 22 436 40 50

### Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 3217/4071

Tabele/Tables 0

Ryciny/Figures 0

Piśmiennictwo/References 63

---

Received: 26.10.2009

Accepted: 10.11.2009

Published: 04.12.2009

### Streszczenie

Pierwszy raport o udanej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych znajdujących się we krwi pępowinowej został opublikowany w 1989 roku. Od tego czasu, opierając się na licznych naukowych i technicznych odkryciach, zasady transplantacji krwi pępowinowej uległy licznym zmianom. Dzisiaj, po ponad dwudziestu latach standardowo wykorzystywanych w Polsce krwiotwórczych komórek macierzystych, w leczeniu używany jest również inny rodzaj komórek obecnych we krwi pępowinowej – mezenchymalne komórki macierzyste. Komórki te można nie tylko namnożyć w celach leczniczych ale także ukierunkowywać w następne wyspecjalizowane linie komórkowe. Doniesienia opisujące zastosowania zróżnicowanych komórek sugerują możliwość ich wykorzystania w leczeniu coraz większej liczby chorób.

**Słowa kluczowe:** krew pępowinowa, komórki macierzyste, multipotencjalne komórki krwiotwórcze, multipotencjalne komórki mezenchymalne

### Summary

The first report about haematopoietic stem cells transplantation from cord blood with good result, was published in 1989. Since then, the major changes have occurred, based on scientific and technical developments. Today, after over twenty years standards use of hematopoietic stem cells, there is another kind of cells from cord blood used in treatment – mesenchymal stem cells. These cells could be not only expanded in order to medical treatment but also differentiate in next specialized cells lines. The articles, describing medical application of differentiated cells, confirm the possibility of more and more diseases treatment.

**Key words:** cord blood, stem cells, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells

## KOMÓRKI MACIERZYTE

Każdy organizm składa się z komórek. W żywym organizmie, systematycznie – przez całe życie – powstają nowe, które następnie dojrzewają, różnicują się w bardziej wyspecjalizowane a na koniec po ściśle określonym czasie, zapisanym w ich materiale genetycznym, obumierają. I właśnie komórki macierzyste (KM) dostarczają nowych pokoleń w miejsce obumarłych. Są to niezróżnicowane komórki, które są zdolne do dojrzewania, podziału przez czas nieokreślony, samoodnawiania i do tworzenia bardziej wyspecjalizowanych komórek. Wszystkie można podzielić na cztery kategorie: 1. Totipotencjalne – jedyne w organizmie, które mogą różnicować się do każdego typu czyli inaczej są zdolne do utworzenia całego organizmu. Przykładem jest powstała w wyniku zapłodnienia zygota, lub blastomery, które powstają w wyniku jej dalszego rozwoju. 2. Pluripotencjalne – powstają podczas kolejnego etapu rozwoju zygoty. Posiadają zdolność różnicowania się do każdego z trzech rodzajów listków zarodkowych: mezodermy, ektodermy i endodermy. Mogą również dać początek każdemu typowi komórek – nie mogą jedynie przekształcić się „z powrotem” w totipotencjalne – obecne na początku rozwoju człowieka. 3. Multipotencjalne – powstające w zakresie „tylko” pojedynczego listka zarodkowego. Komórki te mogą przekształcać się we wszystkie typy komórek tylko w obrębie danego listka zarodkowego z którego pochodzą. Np. w obrębie mezodermy mogą dać początek komórkom szpiku, krwi lub mięśni, do tej grupy należą krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM), których źródłem jest m.in. ludzka krew pępowinowa. 4. Unipotencjalne – ostatnie w rozwoju – różnicują się już tylko do jednego, ściśle określonego typu komórek dojrzałych (np. komórek nabłonka), zachowując jednak w porównaniu z dojrzałymi stałą zdolność podziału.

## ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Istnieją trzy, obecnie powszechnie stosowane w medycynie, źródła KKM: szpik kostny, krew obwodowa i krew pępowinowa.

Pierwsze próby przeszczepiania multipotencjalnych komórek macierzystych zostały przeprowadzone już w 1938 roku przez Jana Stefana Raszka i Franciszka Groera we Lwowie. Polegały one na podawaniu szpiku pobranego z mostka zdrowego dawcy bezpośrednio do jamy szpikowej chorego biorcy. Ze względu na II wojnę światową wyniki opublikowano dopiero w 1948 r. [1] Powyższe próby kontynuowała w Warszawie w latach czterdziestych i pięćdziesiątych Zofia Migdalska [2, 3, 4] a w latach sześćdziesiątych badania kontynuowane były w Poznaniu przez Urszulę Radwańską i Tadeusza Rafińskiego [5]. Jednak dopiero poznanie antygenów zgodności tkankowej u człowieka (Human Leukocyte Antigens – HLA) umożliwiło lepszy, bo dobór zgodnych dawców szpiku i pozwoliło w końcu lat sześćdziesiątych na przeprowadzenie

## STEM CELLS

Each organism consists of cells. In a living organism, systematically – throughout all one's life - there are new ones that are created, which later on mature, differentiate into more specialized ones and finally, after a specific time, imprinted in their genetic material, die away. Precisely, stem cells provide new generations in place of the mortified ones. These are undifferentiated cells, which are capable of maturing, division in an undefined time, self-renewal and creation of more specialized cells. All cells can be divided into four categories: 1. Totipotents – the only ones in the organism that may differentiate into each type, in other words they are capable of creating the whole organism. The zygote created as a result of fertilisation, or blastomeres, which are created due to its further development, constitute an example of that. 2. Pluripotents – they are created during the next stage of zygote development. There have differentiation capacity to each of the three types of embryonal leaf: mesoderm, epiblast and endoblast. They may also originate each type of cells – however, they may not transform themselves ‘back’ to totipotent cells – present at the beginning of human development. 3. Multipotents – created ‘only’ within a single embryonal leaf. These cells may transform to all types of cells only within a given embryonal leaf from which they originate. For example, within the mesoderm, they may originate the bone marrow, blood and muscle cells. Haemafacient stem cells, who originate among others in human umbilical cord blood, belong to this group. 4. Unipotents – the last in the development – differentiate only to one, strictly defined type of mature cells (e.g. epithelium cells), keeping however a constant capacity of division in comparison to the mature ones.

## ORIGINS OF STEM CELLS

There are three, presently widely applied in medicine, origins of haemafacient stem cells: bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood.

The first tests to transplant multipotent stem cells were already carried out in 1938 by Jan Stefan Raszek and Franciszek Groer in Lwów. They consisted in administering the bone marrow drew from the breast bone of a healthy donor directly to the bone marrow canal of a sick host. Due to the Second World War, the results were published only in 1948 [1] The above tests were continued in Warsaw in the 1940s and 1950s by Zofia Migdalska [2, 3, 4], and in the sixties the researches were carried on in Poznań by Urszula Radwańska and Tadeusz Rafiński [5]. However, only the cognition of Human Leukocyte Antigens HLA allowed for an improved one, as the selection of compatible bone marrow donors and allowed in the late 1960s to carry out first successful allografts of stem cells from the bone marrow [6,7]. Thanks to the following improvements, at the end of the 1970s, the bone marrow trans-

pierwszych udanych allogenicznych transplantacji KM ze szpiku [6,7]. Dzięki następnym udoskonaleniom, pod koniec lat siedemdziesiątych transplantacja szpiku z metody eksperymentalnej przeistoczyła się w bardziej skuteczną metodę leczenia [8,9]. Dzisiaj, zabieg pobrania KKM ze szpiku, najczęściej wykonuje się nakłuwając wielokrotnie (w znieczuleniu ogólnym) talerze kości biodrowych. Sam zabieg przeszczepienia pod względem technicznym jest prosty: jest to przetoczenie dożylnie przez cewnik centralny. Powyższa metoda pobierania szpiku jest stosowana regularnie w leczeniu polskich dzieci od grudnia 1989 roku.

Krwiotwórcze komórki macierzyste pochodzące ze zmobilizowanej farmakologicznie krwi obwodowej pobiera się z żył obwodowych (łokciowych lub udowych, rzadziej podobojczykowych). Wybór naczyń krwionośnych zależy od m.in. od wieku, ciężaru ciała dawcy oraz możliwości dostępu do poszczególnych żył. Pobranie następuje przy użyciu separatora komórkowego, którego najważniejsze części to: wirówka zbierająca komórki, system pomp powodujący przepływ krwi obwodowej przez urządzenie oraz panel sterowniczy. Liczba komórek macierzystych w niemobilizowanej krwi obwodowej jest bardzo mała. Dlatego dawcy należy przez parę dni przed zabiegiem wstrzykiwać dożylnie lub podskórnie farmakologiczne czynniki wzrostu odpowiednich linii komórkowych. Pobranie z żył obwodowych jest to trwający parę godzin, złożony zabieg. Aby pobrać odpowiednią liczbę KKM wystarczającą do transplantacji należy najczęściej procedurę minimum raz powtórzyć. Tę metodę pozyskiwania materiału biologicznego do transplantacji u chorych dzieci stosuje się regularnie w Polsce już od 1994 roku.

Pierwszą próbę przeszczepienia krwi pępowinowej (KP) podjęto w 1970 roku. Była to próba leczenia chłopca chorego na białaczkę rozciągniętymi w czasie kilkunastu dni przetoczeniami ośmiu porcji KP. Przeszczepienia te zostały przeprowadzone podczas prowadzonej regularnie standardowej chemioterapii (składającej się wtedy, w porównaniu do dzisiejszej wielolekowej chemioterapii tylko z dwóch leków: enkortonu i 6-mercaptopuryny) bez wcześniejszego przygotowania pacjenta do transplantacji np. chemioterapią lub chemio- i radioterapią [10]. Pierwsze, skuteczne i udokumentowane przeszczepienie allogenicznej (rodzinnej) krwi pępowinowej zostało wykonane w 1988 roku z inicjatywy lekarzy amerykańskich – Broxmeyera i Kurtzberga w paryskiej klinice kierowanej przez E. Gluckmana. Biorcą był 5-letni, mieszkający w USA, chłopiec chory na wrodzoną niedokrwistość Fanconiego, któremu przeszczepiono krew pępowinową nowonarodzonej siostry [11]. Chłopiec został wyleczony, żyje do dziś w USA. Już po pięciu latach, amerykańscy lekarze z Durham, po raz pierwszy przeprowadzili transplantacje allogenicznej krwi pępowinowej od dawcy niespokrewnionego (u dwóch pacjentów z białaczką wysokiego ryzyka) oraz transplantację rodzinnej niezgodnej krwi pępowinowej od siostry dla chorego brata (rów-

plantation transformed itself from an experimental method to a more efficient treatment method [8,9]. Today, the procedure of collecting haemafacient stem cells from the bone marrow is most often performed by multiple paracentesis (in general anesthesia) of wings of ilium. The transplantation procedure itself is simple from the technical point of view: it consists in intravenous transfusion through the central venous catheter. The above method of bone marrow sampling has been applied on a regular basis in the treatment of Polish children since December 1989.

Haemafacient stem cells originating from the peripheral blood pharmacologically mobilised are collected from peripheral veins (cubital or femoral, rarely subclavian veins). The selection of blood vessels depend among others on the age, body mass of the donor and the access to specific veins. The sampling take place by means of a cell separator, whose most important parts are: centrifuge collecting the cells, a system of pipes causing peripheral blood flow through a pilot device or panel. The number of stem cells in non-mobilised peripheral blood is very small. That is why it is advised to inject intravenously or subcutaneously to the donor, for several days prior to the treatment, pharmacological growth factors of appropriate cell lines. Taking sample from peripheral cells is a few-hour-lasting, complex procedure. In order to collect an appropriate number of haemafacient stem cells sufficient for the transplantation, it is advised to repeat the procedure at least one time. This method of acquiring biological material for transplantation in sick children has been regularly applied in Poland since 1994.

The first attempt of umbilical cord blood transplantation was undertaken in 1970. This was an attempt to cure a boy suffering from leukaemia by transfusion of 8 portions of umbilical cord blood in a dozen days intervals. These transplantations were carried out during a regularly performed standard chemotherapy (then consisting of, in comparison to the present-day multi-drug chemotherapy, just two drugs: encorton and 6-mercaptapurin) without priori preparation of the patient to transplantation e.g. chemotherapy or chemo- and radiotherapy [10]. The first efficient and evidenced graft of allogenic (familial) umbilical cord blood was carried out in 1988 at the initiative of American doctors – Broxmeyer and Kurtzberg in a Clinic in Paris conducted by E. Gluckman. The host was a 5-year-old boy, living in the USA, suffering from an innate Fanconi anaemia, to whom umbilical cord blood was transplanted from a newly born sister [11]. The boy was cured. He lives now in the USA. 5 years later, for the first time, American doctors from Durham carried out grafts of allogenic umbilical cord blood from an unrelated donor (in two patients with leukaemia of high risk) and transplantation of familial incompatible umbilical cord blood from the sister to the ill brother (also with leukaemia) [12]. In Poland (Lange, 1996), umbilical cord blood was first transplanted to a boy with a relapse

niez z białaczką) [12]. W Polsce (Lange, 1996), po raz pierwszy KP przeszczepiono chłopcu ze wznową białaczki limfoblastycznej. Przeszczepiona krew pochodziła razem ze szpikiem kostnym pobranym w dniu transplantacji, od młodszej siostry. W 1998 roku w Brazylii odbyło się pierwsze przeszczepienie autologicznej KP. Rodzice zdecydowali się na pobranie i przechowywanie KP córki z przeznaczeniem dla jej starszego brata chorego na białaczkę. Tymczasem córka zachorowała na zwojaka zarodkowego (neuroblastoma). Przeszczepiono jej własną KP uzyskując kompletną remisję [13]. W roku 2000, już po raz drugi w Polsce użyto allogenicznej KP (po raz pierwszy jednak jako jedyne źródła KKM). Dawczynią była młodsza siostra, biorcą 4,5 letni brat z ostrą białaczką szpikową [14]. W 2005 roku, po raz pierwszy w Polsce użyto niezgodnej KP pochodzącej od niespokrewnionego włoskiego dawcy, po raz drugi jako jedyne źródła KKM do leczenia 10-letniego chłopca z wrodzoną niedokrwistością (zespół Fanconiego). W 2007 roku po raz pierwszy na świecie użyto autologicznej KP do przeprowadzenia procedury transplantacji KKM u 3-letniej dziewczynki z białaczką [15].

Dzisiaj, pobranie krwi, która pozostaje po porodzie w łożysku i w sznurze pępowinowym, jest prostym i bezpiecznym zabiegiem. Polega na nakłuciu naczynia krwionośnego sznura pępowiny (po uprzednim odpepnieniu noworodka) i pobraniu pozostawionej w popłodzie krwi do odpowiedniego zestawu. Pobrane komórki z krwi pępowinowej, tak jak komórki ze szpiku i z krwi obwodowej po dodaniu środka kriochronnego (siarkotlenek dwumetylowy), można przechowywać w ciekłym azocie teoretycznie przez kilkadziesiąt lat. Dzisiaj wiadomo, że przechowywane już przez 15 lat, nadal po rozmrożeniu spełniają swoje zadania. Potwierdzono to praktycznie m.in. w Australii [16] oraz w USA, gdzie w ośrodkach uniwersyteckich w Indianapolis i Bethesda kontynuuje się poprzednie badania dotyczące porównywania liczby i funkcji komórek KP porównywanych przed mrożeniem oraz po 5- i 10-letnim okresie przechowywania w ciekłym azocie [17].

### PRZESZCZEPIENIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Jest to procedura polegająca na wymianie (częściowej lub całkowitej) komórek wadliwie funkcjonujących albo zmienionych nowotworowo na prawidłowe komórki macierzyste (KM), które mogą pochodzić od pacjenta (przeszczepienie autologiczne) oraz dawcy (przeszczepienie allogeniczne) spokrewnionego lub niespokrewnionego. W medycynie od lat trzydziestych ubiegłego wieku, najczęściej do przeszczepień (transplantacji) wykorzystuje się multipotentjalne krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM).

of lymphoblastic leukaemia. The transplanted blood originated, together with the bone marrow taken on the day of the transplantation, from the younger sister. In 1998 in Brasil, the first autograft of umbilical cord blood was performed. The parents accepted the collection and preservation of their daughter's umbilical cord blood for her older brother suffering from leukaemia. In the meantime, however, the daughter became ill with embryonal gangliocytoma (neuroblastoma). Her own umbilical cord blood was transplanted leading to complete remission [13]. In 2000, for the second time in Poland allogenic umbilical cord blood was used (for the first time however as the only source of haemafacient stem cells). The donor was a younger sister, the host was her four-and-half-year-old brother with acute myeloid leukaemia [14]. In 2005, for the first time in Poland, an incompatible umbilical cord blood was used, coming from an unrelated Italian donor, for the second time as the only source of haemafacient stem cells for the treatment of a 10-year-old boy with innate anaemia (Fanconiego syndrome). In 2007, for the first time in the world, autologous umbilical cord blood was used in order to carry out the procedure of haemafacient stem cells transplant in a 3-year-old girl with leukaemia [15].

Today, the collection of blood which remains after the delivery in the placenta and the umbilical cord is a simple and safe procedure. It consists in the paracentesis of the blood vessel of the umbilical cord (after prior omphalotomy of the infant) and collection of the remaining blood in the afterbirth for an appropriate package. The collected cells from the umbilical cord blood, as well as the cells from the bone marrow and the peripheral blood after adding the blood protection agent (dimethyl oxygen sulfide), may be preserved in liquid nitrogen theoretically for dozens of years. It is known today that they fulfill their tasks after being preserved for 15 years already, still after thawing. It was confirmed in a practical way, among others in Australia [16] and in USA, where in university centres in Indianapolis and Bethesda previous researches concerning the comparison of the quantity and functionality of umbilical cord blood cells (compared before the freezing and after a 5- and 10 year lasting period of preservation in liquid nitrogen) are being continued [17].

### TRANSPLANT OF STEM CELLS

It is a procedure consisting in (partial or complete) exchange of malfunctioning or neoplasmically changed cells to proper stem cells, which may originate from the patient (autograft) and the related or unrelated donor (allograft). Since the 1930s, multipotent haemafacient stem cells have been used for grafts (transplantations).

## PRZESZCZEPIENIA KRWI PĘPOWINOWEJ Z PBKM SA

Przedstawione powyżej krótkie opisy pobierania komórek macierzystych ze szpiku i z krwi obwodowej wykazują jak łatwą i prostą metodą, w porównaniu do innych metod pobierania, jest pobranie krwi pępowinowej i zawartych w niej komórek macierzystych. Ponadto ograniczenie ilości krwi, którą można pobrać ze sznura pępowinowego i z łożyska może być pokonane, ponieważ można przeznaczyć do przeszczepienia więcej niż jedną porcję krwi pępowinowej, można jednocześnie przeszczepić komórki z różnych źródeł: np. szpiku i krwi pępowinowej. W taki właśnie sposób przeprowadzono w marcu 2007 pierwsze przeszczepienie allogenicznego KP pochodzącej z prywatnego banku (Polski Bank Komórek Macierzystych SA – PBKM SA), które odbyło się w Katedrze i Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Akademii Medycznej we Wrocławiu. Biorczynią była 8-letnia dziewczynka leczona od 2003 roku z powodu zwojaka zarodkowego (IV stopień zaawansowania), u której w 2006 roku wystąpiły objawy wznowy kostno-szpikowej. W dniu transplantacji lekarze uzupełnili brakującą ilość komórek pobierając szpik od rodzinnego, młodszego dawcy, od którego została wcześniej pobrana KP [18]. Drugie przeszczepienie, allogenicznego preparatu również pochodzącego z prywatnego banku (PBKM SA), przeprowadzono w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy. W tym przypadku biorcą była 5-letnia dziewczynka leczona od 2005 roku z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej, u której w 2007 roku wystąpiły objawy wczesnej wznowy choroby. Chorej, w dniu 23 stycznia 2008 roku, przeszczepiono, zgodne w zakresie układu antygenów HLA i niezgodne w zakresie grup krwi, komórki macierzyste pochodzące z KP pobranej podczas porodu młodszej siostry [19]. Trzecie przeszczepienie z tego samego komercyjnego banku (pierwsze autologiczne), przeprowadzono u rocznego dziecka, które przeżyło ciężkie uogólnione uszkodzenie niedokrwienne mózgu w wyniku zatrzymania akcji serca. Ukierunkowane neuralnie komórki, z autologicznej KP podano trzykrotnie w odstępach miesiąca, bezpośrednio do komór bocznych mózgu [20]. Do takich prób wykorzystania KP upoważniają wyniki m.in. licznych polskich doświadczeń na zwierzętach a także europejskich badań u ludzi, które wskazują na możliwość transdiferencjacji (przeróżnicowania) drugiej puli komórek, tzw. mezenchymalnych (tkankowych) komórek macierzystych m. in. w komórki nerwowe. Czwarte przeszczepienie KP z PBKM SA, odbyło się w styczniu 2009 r. w Klinice Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Biorcą przeszczepionej KP jako jedyne źródła KKM był 5-letni chłopiec leczony z powodu zespołu mielodysplastycznego z monosomią 7 chromosomu [21]. Aktualnie (paź-

## GRAFTS OF UMBILICAL CORD BLOOD FROM PBKM SA

The above presented short descriptions of collecting stem cells from bone marrow and peripheral blood show how easy and simple is the method, in comparison to other sampling methods, in collecting umbilical cord blood and the stem cells embedded in it. Moreover, the limitation of the quantity of blood, which can be collected from the umbilical cord and from the placenta may be overcome, as we can allocate for graft more than one portion of umbilical cord blood. We may at the same time graft cells from different sources: e.g. bone marrow and umbilical cord blood. In this way precisely, the first graft of allogenic umbilical cord blood coming from a private bank (The Polish Bank of Stem Cells SA – PBKM SA) was performed in March 2007. It was performed in the Division and Clinic of Bone Marrow Transplantation, Infant Oncology and Haematology, Medical Academy in Wrocław. The host was an 8-year-old girl treated since 2003 due to embryonal gangliocytoma (IV level of severity), in whom in 2006 symptoms of osteomyeloid recurrence appeared. On the day of the graft, the doctor completed the lacking quantity of cells collecting the bone marrow from the familial, younger donor, from whom umbilical cord blood was previously collected [18]. The second graft, of an allogenic preparation also originating from a private bank (PBKM SA), was carried out in the Division and Clinic of Pediatrics, Haematology and Oncology, Collegium Medicum, University of Mikołaj Kopernik in Bydgoszcz. In this case, the host was a 5-year-old girl who has been treated since 2005 due to acute lymphoblastic leukaemia, in whom in 2007 occurred symptoms of early disease recurrence. The patient, on January 23, 2008 underwent a graft, compatible as for HLA antigene arrangement and incompatible as for blood groups, the stem cells originated from umbilical cord blood collected during the delivery of her younger sister [19]. The third graft from the same commercial bank (first autograft), was carried in a 1-year-old infant, who underwent a severe general ischaemic brain damage as a result of heart arrest. The cells, neurologically restricted, from the autologous umbilical cord blood, were administered three times in a month interval, directly to collateral brain ventricles [20]. We are authorized to such attempt of umbilical cord blood use by the results of among other: numerous Polish experiments on animals as well as European studies on people, which pinpoint the possibility of transdifferentiation of the second reserve of cells, so called mesenchymal (tissue) stem cells, among others into nerve cells. The fourth graft of umbilical cord blood from PBKM SA took place on January 2009 in the Clinic of Haematology and Infant Oncology, University of Medicine in Lublin. The host of the grafted umbilical cord blood as the only source of haemafacient stem cells was a 5-year-old boy treated due to myelodysplastic syndrome with monosomy of the 7 chro-

dziernik 2009) PBKM SA przygotowuje się do udostępnienia następných dwóch jednostek do następných transplantacji.

## WSKAZANIA DO PRZESZCZEPIEŃ

Pierwsze dwa raporty Europejskiej Grupy d/s Transplantacji Szpiku i Krwi (European Bone Marrow and Blood Transplantation Group – EBMT) zawierały opisy rodzajów transplantacji oraz wskazania do transplantacji KKM bez podziału na rodzaje źródeł [22, 23]. EBMT jest wiodącym naukowym stowarzyszeniem non-profit reprezentującym 527 naukowe ośrodki europejskie oraz ośrodki spoza Europy, zajmujące się transplantacją komórek lub inną terapią komórkową. Już w trzecim raporcie EBMT (2002), został zamieszczony oficjalny podział źródeł KKM na trzy rodzaje używanych do transplantacji (szpik kostny, mobilizowana krew obwodowa, krew pępowinowa) oraz po raz pierwszy zamieszczono skrócony opis warunków, koniecznych do spełnienia przed transplantacją KKM z krwi pępowinowej [24].

W przedostatnim raporcie EBMT [25] opublikowanym w 2006 r., stwierdzono po raz kolejny, że wskazania do transplantacji KP są takie same, jak w przypadku szpiku kostnego lub mobilizowanej krwi obwodowej. Według EBMT transplantacje KKM, bez względu na ich źródło, przeprowadza się już od wielu lat w określonych jednostkach chorobowych w sposób standardowy (standard of care) – co oznacza, że sposób przeprowadzenia procedury transplantacji został dobrze poznany a jej wyniki zostały zdefiniowane i są statystycznie lepsze od leczenia prowadzonego bez udziału transplantacji [26, 27]. Dzisiejsza medycyna wykorzystuje autologiczne KM uzyskane od pacjenta nawet pomimo równoległe prowadzonego leczenia niektórych chorób. Zabezpieczenie ich już podczas porodu, umożliwia w razie konieczności przeprowadzenia transplantacji szybsze zebranie potrzebnego materiału biologicznego, potrzebnego do wyleczenia pacjenta. Przeszczepienie autologicznych KM znajduje również zastosowanie w leczeniu niektórych chorób nowotworowych. Potwierdzają to również polscy autorzy w opracowaniu, z którego wynika że od 1985 do 2004 roku, tylko w 19 krajach Europy wykonano u dzieci 2342 transplantacje KKM, w tym transplantacje autologiczne wykonano w 1053 a w 1289 przypadkach transplantacje allogeniczne [28].

Wskazaniem do wykonanych już w Polsce u dzieci przeszczepień autologicznych KKM były – według częstości wykonanych transplantacji – choroby rozrostowe układu krwiotwórczego (chłoniaki, białaczki, ziarnica złośliwa) oraz guzy lite (zwojak zarodkowy, guzy kości, mięsak prążkowanokomórkowy, guzy ośrodkowego układu nerwowego). Zaletą przeszczepienia własnych komórek jest m.in. brak możliwości wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (Graft versus Host Disease – GvHD), powikłania występującego po przeszczepieniach komórek allogene-

mosom [21]. At present, (October 2009) PBKM SA is preparing two other units for future grafts.

## INDICATIONS FOR TRANSPLANTATIONS

The first two reports of the European Group for the European Bone Marrow and Blood Transplantation Group - EBMT contained the descriptions of transplantation types and indications for transplantation of haemafacient stem cells without division on types of sources [22, 23]. EBMT is a leading scientific non-profit organisation representing 527 scientific European centres and centres beyond Europe, dealing with cell transplantation or other cell therapy. Already in the third EBMT report (2002), an official division of haemafacient stem cell sources into three types as used for transplantations was printed (bone marrow, mobilised peripheral blood, umbilical cord blood) and for the first time a shortened description of the conditions necessary to be fulfilled before haemafacient stem cell transplantation from the umbilical cord blood was placed [24].

In the penultimate EBMT report [25] published in 2006, it was once again confirmed that indications for umbilical cord blood transplantation are the same as in the case of bone marrow or mobilized peripheral blood. According to EBMT, haemafacient stem cell transplantations, regardless of their source, have been carried out for many years in specific disease entity in standard way (standard of care) – which signifies that the way of carrying out the transplantation procedure has been well recognized and its results have been defined and are statistically better than the treatment carried out without the transplantation participation [26, 27]. The present-day medicine exploits autologous stem cells obtained from a patient even despite parallel treatment of some diseases. Securing them already during the delivery allows, in case of transplantation necessity, for a quicker collection of required biological material, necessary for the patient's recuperation. The transplantation of autologous stem cells can be also applied in the treatment of some neoplastic diseases. This is also confirmed by Polish authors in the case study, from which it appears that between 1985 and 2004, in 19 European countries only 2342 haemafacient stem cell transplantations were carried out, out of which 1053 were autografts and 1289 - allografts [28].

An indication for the already performed haemafacient stem cell autografts in Poland in children were – according to the frequency of performed transplantations – haematological malignancies (lymphomas, leukemia, Hodgkin's disease) and solid tumours (embryonal gangliocytoma, bone tumours, sarcoma cellularstrated, tumours of the central nervous system). One advantage of grafting one's own cells is among others the lack of possibility of Graft versus Host Disease – GvHD occurrence, a complication occurring after allogenic cell grafts (from siblings, parents or unrelated donor). This disease can run in a damaging way for the

nicznych (od rodzeństwa, rodziców lub dawcy niespokrewnionego), która to choroba może przebiegać w sposób szkodliwy dla biorcy. W przypadku braku powyższej reakcji po transplantacji komórek macierzystych, nie występuje również korzystna reakcja przeszczep przeciwko nowotworowi skierowana przeciwko chorobom rozrostowym układu krwiotwórczego, np. reakcja przeszczep przeciwko białaczce (Graft versus Leukemia Reaction – GvLR) lub przeciwko guzom litym (Graft versus Tumour Reaction – GvTR). Ponadto o rodzaju wykonywanej transplantacji decyduje bowiem bardzo wiele czynników. Jest to przede wszystkim rodzaj choroby i określany przed rozpoczęciem leczenia stopień jej klinicznego zaawansowania („ciężkość” choroby), kolejność rzutu choroby (czy jest to pierwsze zachorowanie czy wznowa choroby). Również bardzo ważna jest statystyczna możliwość uzyskania lepszej skuteczności leczenia za pomocą m.in. mniej toksycznej i przez to bezpieczniejszej dla pacjenta autologicznej transplantacji. Poza tym szybkie znalezienie zgodnego w zakresie wszystkich badanych 10 antygenów zgodności tkankowej dawcy bywa niełatwe a przedłużające się poszukiwania kolejnego dawcy mogą zabierać dużo czasu. Dlatego między innymi były, są i będą wykonywane przeszczepienia autologicznych KKM.

Wskazaniem do przeprowadzenia u dzieci w Polsce przeszczepień allogenicznych KKM były: choroby rozrostowe – (wg częstości przeszczepiania): ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa, zespoły mielodysplastyczne, chłoniaki złośliwe, mięsak Ewinga, zwojak zarodkowy, oraz choroby nierozrostowe – (wg częstości przeszczepiania): ciężka nabyta niedokrwistość aplastyczna, wrodzone niedobory odporności, wrodzone zaburzenia metabolizmu, niedokrwistość Blackfana-Diamonda, niedokrwistość Fanconiego.

## KOMÓRKI MEZENCHYMALNE

Jak to się dzieje, że przeszczepiając krwiotwórcze komórki macierzyste, nie tylko rekonstruujemy układ krwiotwórczy ale również funkcję innych narządów?

Badając szpik i krew pępowinową, okazało się wielokrotnie w przeszłości a obecnie również wiele wyników badań doświadczalnych i klinicznych wskazuje, że inne [29] niż hematopoetyczne (krwiotwórcze) komórki macierzyste z KP mogą różnicować się również na komórki różnych innych tkanek [30, 31, 32].

W Polsce już w 2002 roku opisano laboratoryjne próby wykorzystania KP w leczeniu chorób powodujących uszkodzenia mózgu. W laboratorium Zakładu Neurobiologii Naprawczej PAN w Warszawie uzyskano z KP niezróżnicowane komórki, które ulegały dalszemu różnicowaniu w komórki nerwowe – neurony, astrocyty i oligodendrocyty [33]. W doświadczeniach niemieckich wykazano dodatkowo, że powyższe komórki mezenchymalne (tkankowe) są „plastyczne” i różnicują się nie tylko w komórki tkanki nerwowej

host. In case of lack of the above reaction after stem cell transplantation, there is also no advantageous reaction graft against tumour directed against haematological malignancies, e.g. Graft versus Leukemia Reaction – GvLR or Graft versus Tumour Reaction – GvTR. Moreover, many factors influence the type of performed graft. This is mainly the type of the disease and the level of its clinical severity diagnosed before the beginning of the treatment (‘severity’ of the disease), sequence of the attack (whether it is the first disease incidence or disease recurrence). The statistical possibility of obtaining a better efficiency in the treatment by means of - among others - less toxic and so safer for the patient autograft is also very important. Besides that, the quick finding of a compatible within the scope of all examined 10 antigens donor’s tissue compatibility may be difficult and the overrunning search for another donor may take much time. That is why there were, still are and are going to be haemafacient stem cell autografts performed out of many others grafts.

One indication for performing haemafacient stem cell allografts among children in Poland were: malignancies – (according to graft frequency): acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, malignant lymphomas, Ewing sarcoma, embryonal gangliocytoma, and non-malignant diseases – (according to graft frequency): severe acquired hypoplastic anaemia, innate immunodeficiencies, innate metabolism disorders, Blackfan-Diamond anaemia, Fanconi anaemia.

## MESENCHYMAL CELLS

How does it occur that when grafting haemafacient stem cells, not only do we reconstruct the haemafacient system, but also the function of other organs?

On examination of the bone marrow and the umbilical cord blood, it turned out several times in the past and also at present many results of experimental and clinical studies indicate that other [29] than haemafacient stem cells from the umbilical cord blood may differentiate themselves to cells of various other tissues [30, 31, 32].

In Poland, already in 2002, first bench tests of using umbilical cord blood in the treatment of diseases generating brain damages were described. In the laboratory of the Division of Reconstructive Neurobiology, Polish Academy of Science in Warsaw, on the base of umbilical cord blood we obtained undifferentiated cells, which underwent further differentiation into nerve cells – neurons, macroglia cells and oligodendrocytes [33]. German studies additionally indicate that the above mesenchymal cells are ‘flexible’ and differentiate themselves not only into cells of the nerve tissue (brain), but also into cells of bones, chondrus, liver and cardiac muscle. The described cells were called Unrestricted Somatic Stem Cells - USSCs [34]. Moreover, a team

(mózgu) ale również w komórki kości, chrząstki, wątroby i mięśnia sercowego. Opisane komórki nazwano nieukierunkowanymi somatycznymi komórkami macierzystymi (Unrestricted Somatic Stem Cells – USSCs) [34]. Ponadto zespół badaczy szwajcarskich opublikował w 2004 r. wyniki doświadczeń, w których przy użyciu technik inżynierii genetycznej z KP uzyskał tkankę, która może być zastosowana np. jako autologiczny przeszczep naczyń, czyli może zostać przeszczepiona bez żadnego ryzyka, że zostanie odrzucony przez organizm chorego biorecy [35]. Dodatkową zaletę stanowi fakt, że zamrożone komórki z krwi pępowinowej mogą być zastosowane w dowolnym terminie, kiedy zaistnieją optymalne warunki do wykonania zabiegu chirurgicznego. Takie przeszczepienia mogą być wykorzystywane m.in. w chirurgicznym leczeniu wrodzonych wad serca u noworodków [36]. Możliwość wyprodukowania fragmentów naczyń krwionośnych z własnych komórek potwierdziły późniejsze międzynarodowe badania, w których również brali udział polscy naukowcy [37].

Dwudziesty pierwszy wiek nadal przynosi odkrycia zaskakujących możliwości krwi pępowinowej w coraz to innych dziedzinach medycyny. W 2005 r. naukowcy angielscy, kontynuując badania nad możliwościami odnowy i transplantacji komórek wątroby [38, 39, 40] opisali pierwszą na świecie laboratoryjną hodowlę, komórek pochodzących z KP charakteryzującą się ekspresją markerów błony komórkowej charakterystycznych dla hepatocytu oraz posiadających zdolność produkcji albumin [41]. Amerykanie przeprowadzili zróżnicowanie komórek z KP w część nabłonka dróg oddechowych – pneumocyty typu II – występujące na poziomie pęcherzyków płucnych. Produkcję białka C – charakterystyczną dla pneumocytów – potwierdzono badaniami immunofluorescencyjnymi jak i badaniem metodą Real Time PCR [42]. Międzynarodowy (amerykańsko – francusko – brytyjski) zespół naukowców odkrył nową metodę pozyskiwania *de novo* insuliny. Jest to pierwsze doniesienie o możliwości laboratoryjnego wytworzenia insuliny przy pomocy KM pochodzących z ludzkiej KP [43]. Poza próbami laboratoryjnymi próbuje się leczyć cukrzycę typu 1 również klinicznie – przeszczepiając u *de novo* rozpoznanych pacjentów autologiczne KM [44] podkreślając pozytywne znaczenie zawartych w KP limfocytów regulatorowych CD4+CD25+ (regulatory T cells -Treg) [45]. W Polsce również próbuje się przeszczepiać autologiczne komórki celem wyleczenia z cukrzycy [46]. W leczeniu powikłań cukrzycy również stosuje się KP. Podstawą zastosowania KP były badania potwierdzające jej zdolność do produkcji tkanki nabłonkowej, przydatnej w leczeniu skórnych powikłań cukrzycy lub innych ran skóry [47, 48], chorób rogówki [49], chorób przewodu pokarmowego [50] i chorób płuc [51].

Powyższe przykłady świadczą o licznych podejmowanych próbach wykorzystania KP w leczeniu chorób nienowotworowych powodujących uszkodzenia po-

of researchers from Switzerland published in 2004 the outcomes of some experiments, in which – through the use of genetic engineering techniques – they obtained from umbilical cord blood a tissue which can be applied as e.g. a vascular autograft, that is it can be transplanted without risk of being rejected by the organism of the ill host [35]. Another advantage is that the frozen cells from the umbilical cord blood may be applied any time, when there are optimal conditions for carrying out the surgical intervention. Such grafts may be exploited among others in surgical treatment of innate cardiac defect in new-born babies [36]. Possibilities of producing fragments of blood vessels from one's own cells were confirmed by later international studies, in which Polish scientists took part [37].

The 21st century still brings us discoveries of surprising possibilities of umbilical cord blood in different fields of medicine. In 2005, British scientists, continuing the studies on the possibilities of regeneration and transplantation of liver cells [38, 39, 40] described the first in the world laboratory breeding of cells originating from umbilical cord blood characterizing with the expression of markers of cell membrane characteristic for hepatocyte and having the capacity of albumen production [41]. The Americans have carried out cell differentiation from umbilical cord blood into a part of epithelium of respiratory ways – II type pneumocytes – occurring on pulmonary alveoli level. The production of C protein – characteristic for pneumocytes – was confirmed by immunofluorescent studies and Real Time PCR method study [42]. The international (American – French – British) team of scientists discovered a new method of insulin acquisition *de novo*. This is the first report on the possibility of laboratory insulin creation by means of stem cells originating from human umbilical cord blood [43]. Besides bench tests, an attempt is made to cure clinically diabetes of type I as well – transplanting in *de novo* diagnosed patients autologous stem cells [44] underlining the positive significance of included in umbilical cord blood regulatory T cells - Treg CD4+CD25+ [45]. In Poland there are also attempts to transplant autologous cells in order to cure diabetes [46]. Umbilical cord blood is also applied in the treatment of diabetes complications. The basis for umbilical cord blood application were studies confirming its ability to produce epithelial tissue, vulnerary in the treatment of cutaneous complications of diabetes or other skin wounds [47, 48], cornea diseases [49], gastro-intestinal tract diseases [50] and lung diseases [51].

The above-mentioned examples bear witness of numerous undertaken attempts of using umbilical cord blood in the treatment of neoplastic diseases causing failures of specific tracts, organs as well as brain. Continuing researches on the possibilities of curing the central nervous system, Polish scientists confirmed that undifferentiated cells, undergoing further differentiation into nerve cells, may temporarily possess 'pluripotent' genes (Oct3/4, Sox2, Nanog), and then differentiate into



szczególnych układów, narządów jak i również mózgu. Kontynuując swoje badania nad możliwościami leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego, polscy naukowcy potwierdzili, że niezróżnicowane komórki, ulegające dalszemu różnicowaniu w komórki nerwowe, mogą posiadać czasowo geny „pluripotencjalności” (Oct3/4, Sox2, Nanog), a następnie różnicują się w kierunku progenitorów neuralnych [52]. Część hodowli zachowuje jednak swoje cechy i pozwala na długotrwałą hodowlę komórek, które nie są do końca zróżnicowane [53]. Przeszczepione autologiczne komórki ukierunkowane neuralnie mają albo uzupełniać utracone komórki albo wspomagać pośrednio regenerację tkanki. Co już zostało w Polsce wykorzystane w praktyce klinicznej.

## NAMNAŻANIE

O wartości krwi pępowinowej jako materiału biologicznego do przeszczepienia świadczy nie tylko jej ilość pobrana podczas porodu. Drugim wstępnym, ważnym parametrem jest zawartość komórek jednojądrzastych (leukocytów) w mikrolitrze. Uwzględnienie powyższych obu parametrów pozwala dopiero wstępnie ocenić „wartość” krwi pępowinowej jako potencjalnego źródła rekonstrukcji układu krwiotwórczego. Ostateczna ocena preparatu jest jednoznaczna jednak dopiero po dokładnym określeniu ilości zawartych w niej KKM. W przypadku cięższego pacjenta, można zgodne preparaty KP z biorcą łączyć i podawać w zwielokrotnionej liczbie (przeszczepienie sekwencyjne), tak aby liczba przeszczepianych KKM była zawsze odpowiednio proporcjonalna do ciężaru ciała chorego biorcy. Istnieje również możliwość łączenia porcji KP i szpiku lub krwi obwodowej po mobilizacji. Ponadto na świecie, po kilkunastu latach badań [54, 55] wykonuje się już przeszczepienia z namnożonych poza organizmem komórek macierzystych krwi pępowinowej [56, 57, 58]. W Polsce, jak na razie, technologia ta nie jest dostępna. Natomiast na świecie wykonano wg różnych źródeł nawet kilkadziesiąt przeszczepień z namnożonych poza organizmem komórek macierzystych krwi pępowinowej. W ostatnich latach, we Włoszech, Holandii i Szwecji przeprowadza się już nawet przeszczepienia krwi pępowinowej razem z komórkami mezenchymalnymi od rodziców leczonych dzieci [59]. Metoda ta zastosowana u 7 dzieci (m. in. u 5 z ostrą białaczką limfoblastyczną), w przeciwieństwie do 21 pacjentów z grupy kontrolnej, nie dała żadnych powikłań a przeciwnie wstępnie została uznana za metodę leczenia obniżającą ryzyko powikłań potransplantacyjnych. Kolejnym przykładem dotyczącym uzupełnienia liczby komórek KP poprzez namnażanie przed transplantacją komórek pochodzących ze szpiku rodziców są m.in. włosko-szwedzkie badania [60]. Być może następną możliwością skrócenia okresu odnowy układu krwiotwórczego po transplantacji będzie podawanie KP nie dożylnie, tylko bezpośrednio do kości talerza biodrowego [61]. Według autorów bezpośrednio podawanie komórek krwi pępowinowej do kości powoduje 100%

neutral progenitors [52]. Part of the cell culture maintain, however, its traits and allows for a long-lasting cell culture, which are not completely differentiated [53]. Transplanted autologous cells neutrally restricted have either to supplement the lost cells or indirectly support tissue regeneration. This has already been used in clinical practice in Poland.

## PROLIFERATION

The quantity of umbilical cord blood collected during the delivery does not constitute the only evidence of its value as a biological material for transplantation. Another preliminary, important parameter is the content of mononuclear cells (leukocytes) in a microlitre. Taking into account both above-mentioned parameters allows only for a preliminary evaluation of umbilical cord blood 'value' as a potential source of haemafacient system reconstitution. The definitive preparation estimation is unequivocal only after exact determination of haemafacient stem cell quantity included in it. In case of a more severe case, compatible preparations of umbilical cord blood with the host may be associated and administered in multiple number (sequential graft), so that the number of transplanted haemafacient stem cells is always respectively proportional to the body mass of the host patient. There is also a possibility of connecting umbilical cord blood portion with the bone marrow portion or the peripheral blood portion after mobilisation. Moreover, all over the world, after several years of studies [54, 55] transplantations from proliferated stem cells of umbilical cord blood beyond the organism have been already carried out [56, 57, 58]. In Poland, as for now, this technology is not available. However, all over the world, according to different sources, as many as several dozens of transplantations have been performed on the basis of proliferated beyond the organism stem cells of umbilical cord blood. In the last years, in Italy, Holland and Sweden transplantations of umbilical cord blood have been carried out together with mesenchymal cells from parents of cured children [59]. This method applied in 7 children (among others in 5 children with acute lymphoblastic leukemia), contrary to 21 patients from the control group, has not brought any complications. By contrast, it was tentatively conceded as a method of treatment reducing the risk of post-transplantation complications. Italian and Swedish studies are another example concerning the supplementation of the quantity of umbilical cord blood cells through proliferation prior to the transplantation of cells deriving from the parents' bone marrow [60]. Maybe the next possibility of shortening the period of haemafacient system renewal after the transplantation would be the administration of umbilical cord blood not intravenously, but directly to the wings of illium [61]. According to the authors, the direct administration of umbilical cord blood to the bones leads up to a 100% acceptance of the grafted material, a quicker maturity and differentiation of grafted cells, a shorter renewal

przyjęć przeszczepionego materiału, szybsze dojrzewanie i różnicowanie się przeszczepionych komórek, krótszy czas odnowy układu krwiotwórczego oraz zredukowaną ilość przypadków reakcji GvHD. Poza tym nie jest już dzisiaj problemem, również w Polsce, w przypadku ciężkiego pacjenta przeszczepiać jednocześnie dwie jednostki KP [62]. Natomiast w przyszłości prawdopodobnie będzie już można po wewnątrzmacicznym zdiagnozowaniu choroby, przeszczepiać choremu komórki allogenicznym KP jeszcze przed jego urodzeniem (in utero hematopoietic cell transplantation – IUHCT) [63].

Podsumowując należy podkreślić główne zalety transplantacji komórek macierzystych: zwiększa się systematycznie liczba wykonywanych procedur, rośnie liczba oraz rozwijają się nowe techniki transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej, powstają nowe i coraz szersze możliwości wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Podstawą do sformułowania powyższych wniosków może być ponad 100, przeprowadzonych w przeszłości i zakończonych do dnia dzisiejszego oraz osiem prowadzonych aktualnie, europejskich badań naukowych, dotyczących zastosowania KM w wielu dziedzinach medycyny.

Obecnie dla transplantologii komórek jest charakterystyczny stały, coraz szybszy rozwój. W samej tylko Europie systematycznie zwiększa się liczba transplantacji. Dwadzieścia lat temu transplantację KKM przeprowadzano rocznie w około 4 000 przypadków. Dziesięć lat temu, liczba zwiększyła się do 18 tysięcy a w 2007 roku ilość transplantacji przekroczyła liczbę 29 tysięcy. Liczba wykonanych na całym świecie transplantacji tylko w 2008r nadal wzrastała i zgodnie z ostatnimi statystycznymi obliczeniami Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT) wynosiła ponad 54 tysiące przeprowadzonych procedur. W roku 2008 przeprowadzono 269 transplantacji w leczeniu chorób związanych z układem krążenia. W leczeniu narządu ruchu, KKM użyto w 69 przypadkach. Komórki mezenchymalne również tylko w 2008 roku użyto w 221 przypadkach. Łącznie komórki krwiotwórcze i komórki mezenchymalne zostały użyte w ubiegłym roku w leczeniu nowych jednostek chorobowych podczas 699 procedur.

Tłumacząc stale rosnącą liczbę transplantacji oraz innych procedur związanych ze stosowaniem dwóch rodzajów komórek macierzystych (krwiotwórczych i tkankowych), można założyć, że nie tylko systematycznie zwiększa się liczba transplantacji w leczeniu chorób już podlegających tej procedurze, ale należy również założyć, że wprowadzenie i zwiększanie liczby transplantacji w nowych jednostkach chorobowych jest wynikiem pełnej akceptacji tej metody leczenia. Na świecie i w Europie systematycznie wprowadza się tę metodę leczenia w nowych gałęziach medycyny stale szukając możliwości zastosowania transplantacji komórek macierzystych w leczeniu coraz szerszej liczby chorób. Nawet do tej pory w ten sposób zupełnie nieleczone. Co dobrze rokuje na przyszłość.

time of haemafacient system and a reduced number of GvHD reaction cases. Besides this, also in Poland it does not constitute a problem today, in case of severe patient's condition, to transplant simultaneously two entities of umbilical cord blood entities [62]. Whereas in future, there will probably be a possibility of intrauterine disease diagnosis, transplantation of an allogeneous cell from the umbilical cord blood still before its birth (in utero hematopoietic cell transplantation – IUHCT) [63].

To sum up, it is necessary to underline the main advantages of stem cells transplantation: it systematically increases the number of performed procedures, we observe an increasing number and development of new transplantation techniques of haemafacient stem cells deriving from umbilical cord blood, newer and wider possibilities of using mesenchymal stem cell in regenerative medicine are being created. The basis of the above-mentioned conclusions are more than 100, European scientific researches carried out in the past and finished as well as presently carried out, concerning the application of stem cells in many fields of medicine.

At present, cell transplantation is characterized by a constant, ever faster development. In Europe only, the number of transplantation has been rising systematically. Twenty years ago, haemafacient stem cells transplantation was carried out annually in around 4 000 cases. Ten years ago, this number has doubled to 18 thousands and in 2007, the number of transplantations surpassed 29 thousands. The number of performed transplantations worldwide in 2008 only was rising and in accordance with the latest statistics of Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT), it amounted to more than 54 thousand performed procedures. In 2008, 269 transplantations were carried out in the treatment of diseases linked with circulatory system. In the treatment of the motor organ, haemafacient stem cells were used in 69 cases. Mesenchymal cells were also used in 221 cases in 2008. Altogether, haemafacient cells and mesenchymal cells were used in the previous year in the treatment of new disease entities in 699 procedures.

Explaining the constantly rising number of transplantations and other procedures linked with the application of two types of stem cells (haemafacient and tissue), we may assume that not only is the number of transplantations in the treatment of diseases already submitted to this procedure rising, but we should also assume the introduction and rise in the number of transplantations in new disease entities to be a result of full acceptance of this treatment method. All over the world and in Europe, this method of treatment is systematically implemented in new medical branches constantly looking for possibilities of applying the transplantation of stem cells in the treatment of a bigger and bigger number of diseases not having been treated before in this way. It portends well for the future.

## Piśmiennictwo / References:

1. **Raszek-Rozenbusch JS.** Technika i wskazania leczniczego śródszpikowego przetaczania szpiku kostnego u dzieci. *Przegl Lek* 1948; 4: 109.
2. **Migdalska-Romaniuk Z.** Przypadek choroby Werlhofa leczonej przeszczepieniem szpiku. *Pol Arch Med Wew* 1952; 22: 449.
3. **Migdalska-Romaniuk Z.** Leczenie skaz krwotocznych przeszczepieniami szpiku z uwzględnieniem metody i wskazań. *Pol Arch Med Wew* 1955; 1a: 157.
4. **Migdalska Z.** Special section - transplantation of bone marrow. *Blood* 1958, 13 (3), 300.
5. **Rafiński T, Radwańska U.** Poszukiwania nowych metod leczenia w białaczce u dzieci. *Pamiętnik XIII Zjazdu PTP* 1962, s. 173.
6. **Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM.** Bone marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968; 292: 1364-1366.
7. **Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD i wsp.** Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 292: 1366-1369.
8. **Thomas ED, Storb R.** Technique for human marrow grafting. *Blood* 1970; 36: 507-515.
9. **Thomas ED, Buckner CD, Banaji M i wsp.** One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977; 49: 511-533.
10. **Ende M, Ende N.** Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. *Virginia Med J* 1972; 99: 276-280.
11. **Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD i wsp.** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anaemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N Eng J Med* 1989; 321: 1174-1178.
12. **Kurtzberg J, Graham M, Casey J i wsp.** The use of umbilical cord blood in mismatched and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells* 1994; 20: 275-283.
13. **Ferreira E, Pasternak J, Bacal N i wsp.** Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 1041-1041.
14. **Pieczonka A, Wachowiak J, Mariańska B, Boruczkowski D i wsp.** Allogeniczna transplantacja krwi pępowinowej poprzedzona przygotowaniem chemicznym o zmniejszonej toksyczności u dziecka z HR-AML w I CR – opis przypadku. *Pediatrics Praktyczna* 2002; 10: 284.
15. **Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D i wsp.** First Report of Autologous Cord Blood Transplantation in the Treatment of a Child With Leukemia. *Pediatrics* 2007; 119: 296-300.
16. **Spurr E, Wiggins N, Marsden K i wsp.** Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage. *Cryobiology* 2002; 44: 210-217.
17. **Broxmeyer H, Srour E, Hanco G i wsp.** High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 645-650.
18. **Boruczkowski D, Kalwak K, Chybicka A.** The first cord blood transplantation from commercial cord blood bank in Poland. W: International Conference "Stem cell and cell therapy"; Abstracts and Presentation. 2 Nov. 2007; Riga, Latvia.
19. **Boruczkowski D, Sabliński J, Oldak T i wsp.** Pierwsze w Polsce transplantacje krwi pępowinowej z komercyjnego banku – opis dwóch przypadków. *Onkologia Polska* 2008; 11(supl. 1): 74.
20. **Janowski M, Kmieć T, Jurkiewicz E i wsp.** Umbilical Cord Blood – derivatives for treatment of global cerebral ischemic injury in one year old child – a case study. W: Abstract Book of 39<sup>th</sup> Congress of the Polish Society of Neurosurgeons and the Nursing Section with the participation of the Hellenic Neurosurgical Society. 17 – 20 Sept. 2009; Mikołajki, Poland.
21. **Boruczkowski D, Sabliński J, Oldak T i wsp.** Pierwsze w Polsce transplantacje krwi pępowinowej z komercyjnego banku – opis trzech przypadków. *Przegląd Pediatryczny* 2009; 39(supl 1): 123.
22. **Schmitz N, Gratwohl A, Goldman JM.** Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1996 and proposals for an operational classification. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 471-477.
23. **Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D i wsp.** Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders. Current practice in Europe in 1998. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1-7.
24. **Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T i wsp.** Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions, current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 639-646.
25. **Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzano-Calvo M i wsp.** Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definition and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 439-449.
26. **D. Boruczkowski, J. Malicki, A. Pieczonka, G. Stryczyńska, M. Leda, J. Wachowiak:** Allogeniczna transplantacja szpiku kostnego poprzedzona frakcjonowanym napromienianiem całego ciała u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną. *Współ Onkol* 1999; 3: 209-211.
27. **Wachowiak J, Boruczkowski D, Chybicka A i wsp.** Allogeniczna transplantacja szpiku u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną – raport Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków. *Pediatrics Praktyczna* 2002; 10: 23-26.
28. **Wachowiak J, Labopin M, Miano M i wsp.** Haematopoietic stem cell transplantation in children in eastern European countries 1985 – 2004: development, recent activity and role of the EBMT / ESH Outreach Programme. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: S112 – S117.
29. **Rogers I, Yamanaka N, Bielecki R i wsp.** Identification and analysis of in vitro cultured CD45-positive cells capable of multi lineage differentiation. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1839-1852.
30. **Koc O, Lazarus HM:** Mesenchymal Stem Cells : heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 235-239.
31. **McGuckin CP, Forraz N, Alouard Q, Pettengell R.** Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 2004; 295: 350-359.
32. **Kucia M, Halasa M, Wysoczyński M.** Morphological and molecular characterization of novel population of

- CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human umbilical cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007; 21: 297-303.
33. **Bużanska L, Machaj EK, Zablocka B i wsp.** Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; 115: 2131-2138.
  34. **Kögler G, Sensken S, Aires JA i wsp.** A new Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123 – 135
  35. **Schmidt D, Mol A, Odermatt B i wsp.** Umbilical Cord Blood Derived Endothelial Progenitor Cells for Tissue Engineering of Vascular Grafts. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 2094-2098.
  36. **Schmidt D, Asmis LM, Odermatt B i wsp.** Engineered Living Blood Vessels: Functional Endothelia Generated From Human Umbilical Cord – Derived Progenitors. *Ann Thorac Surg* 2006; 82: 1465-1471.
  37. **McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W i wsp.** Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* 2009; 373: 1440 – 1446.
  38. **Fausto N, Campbell JS.** The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117–130.
  39. **Austin TW, Lagasse E.** Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120: 131–135.
  40. **Yoon B-I, Choi Y-K, Kim D-Y.** Differentiation processes of oval cells into hepatocytes: proposals based on morphological and phenotypical traits in carcinogen – treated hamster liver. *J Comp Pathol* 2004; 131: 1-9.
  41. **McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO i wsp.** Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005, 38: 245-255.
  42. **Berger MJ, Adams SD, Tigges BM i wsp.** Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 480-487.
  43. **Denner L, Bodenbug Y, Zhao JG i wsp.** Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif* 2007; 40: 367–380.
  44. **Hussain M.A., Theise N.D.** Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet* 2004, 364: 203-205.
  45. **Haller MJ, Viener H-L, Wasserfall C i wsp.** Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 2008; 36: 710-715.
  46. **Starski E, Torosian T, Paluszewska M i wsp.** Alleviation of exogenous insulin requirement in type 1 diabetes mellitus after immunoablation and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119: 422-426.
  47. **Badiavas E, Abedi M, Butmarc J i wsp.** Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003; 196: 245 – 250.
  48. **Valbonesi M, Giannini G, Migliori F i wsp.** Cord blood stem cells for wound repair. Preliminary report of 2 cases. *Transfus Apher Sci* 2007; 30: 153 – 156.
  49. **Germain L, Auger FA, Grandbois E i wsp.** Reconstructed Human Cornea Produced *in vitro* by Tissue Engineering. *Pathobiology* 1999; 67: 140-147.
  50. **Burton RK, Traynor A, Oyama Y, Craig R.** High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003; 101: 2064-2066.
  51. **Machiarini P, Junnebluth P, Go T i wsp.** Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023 – 2030.
  52. **Habich A, Jurga M, Markiewicz I i wsp.** Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured *in vitro*. *Exp Hematol* 2006; 34: 914-925.
  53. **Sun W, Bużanska L, Domańska-Janik K i wsp.** Voltage - Sensitive and Ligand-Gated Channels in Differentiating Neural Stem-Like Cells Derived from the Non-hematopoietic Fraction of Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* 2005; 23: 931–945.
  54. **Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S i wsp.** Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4109-4113.
  55. **Capmany G, Querol S, Cancelas JA i wsp.** Short-term, serum-free, static culture of cord blood – derived CD34+ cells: Effects of FLT3-L and MIP-1 alpha on *in vitro* expansion of haematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1999; 84(8): 675 - 682
  56. **Pecora AL, Stiff P, Jennis A i wsp.** Prompt and durable engraftment in two older adult patient with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using *ex vivo* expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 797-799.
  57. **Shpall EJ, Quinones R, Giller G i wsp.** Transplantation of Ex Vivo Expanded Cord Blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 368-376.
  58. **Jaroscak J, Goltry K, Smith A i wsp.** Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo*–expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003; 101: 5061-5067.
  59. **Bernardo ME, Ball L, Cometa A i wsp.** Co-transplantation of parental mesenchymal stem cells to improve outcome of cord blood transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(S1): S52.
  60. **Galski H, Bar I, Treves AJ i wsp.** A novel MDR-dependent pharmacological approach for *ex-vivo* expansion of haematopoietic stem cells from human cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: S126 – S127
  61. **Raiola AM, Ibatici A, Gualandi F i wsp.** Direct intra – bone marrow transplant of cord blood cells : a way to overcome delayed engraftment in adult patients. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: S31.
  62. **Jędrzejczak W, Rokicka M, Urbanowska E i wsp.** Simultaneous transplantation of two allogeneic units of cord blood in an adult patient with acute myeloblastic leukemia. A case report. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53: 364-368.
  63. **Liuba K, Pronk C, Stott S, Jacobsen SE.** Polyclonal T-cell reconstitution of X-SCID recipients after *in utero* transplantation of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Blood* 2009; 113: 4790-4798.