

PROJEKTAS

Techninė galimybių studija

„Virkštelės kraujo ir audinio kamieninių ląstelių terapinės galimybės“

Parengta pagal sutartį tarp UAB Placenta ir Vilniaus universiteto

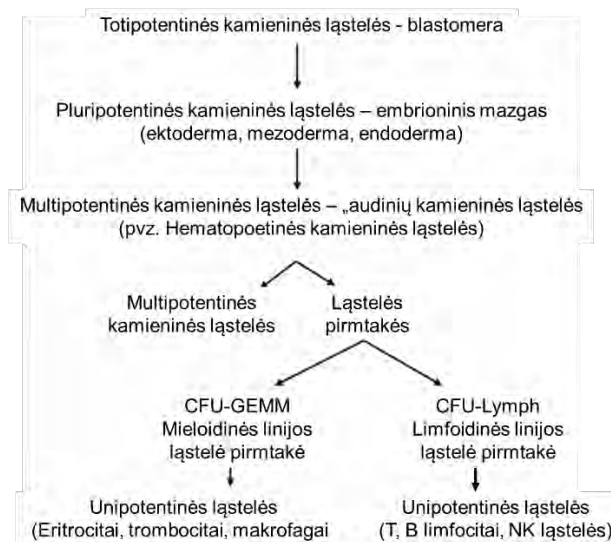
Vilnius, 2020

Turinys

1. Hematopoezė.....	3
2. Virkštelės anatomija	4
Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės	5
3. Virkštelės kraujas.....	6
Virkštelės kraujo hematopoetinių ląstelių morfologija.....	7
Virkštelės kraujyje aptinkamos kolonijas formuojančių ląstelių grupės	8
Imunofenotipas	8
Virkštelės kraujo kamieninių ląstelių plitimas ir proliferacija.....	9
<i>In vivo</i> tyrimai	10
4. Metodai: virkštelės kraujo išskyrimas ir hematopoetinių kamieninių ląstelių išskyrimas ir dauginimas	11
Kraujo surinkimas.....	11
Ląstelių išskyrimas	11
Užšaldymas	13
Ląstelių padauginimas: metodų trūkumai ir privalumai	14
5. Klinikiniai tyrimai.....	17
6. Patentai.....	20
7. Virkštelės audinio kamieninių ląstelių dauginimas ir terapinės galimybės.....	27
8. Iš virkštelės kraujo ir audinio išgautų ląstelių panaudojimas ir terapinės galimybės...29	29
9. Apibendrinimas	35
Literatūros sąrašas	37

1. Hematopoezė

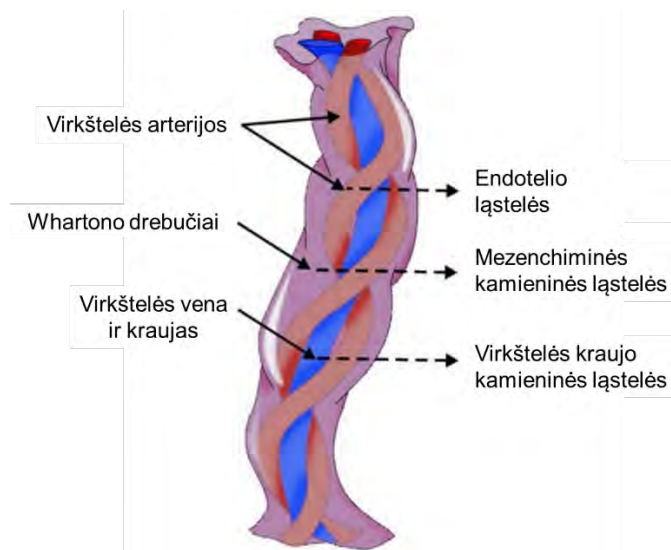
Blastomeros ląstelės yra pirmosios kamieninės ląstelės žmogaus kūne. Šios ląstelės totipotentinės ir gali išsivystyti į bet kokio tipo ląsteles. Embriono gastruliacijos etape ląstelės pradeda specififikacijos (t.y. diferenciacijos) procesą - susidaro dviejų tipų ląstelės: trofoblastai ir embrioninis mazgas. Embrioniniame mazge esančios ląstelės vadinamos pliuripotentinėmis ląstelėmis – jos geba diferencijuotis į visų tipų ląsteles: ektodermos, mezodermos ir endodermos. Šios ląstelės negali diferencijuotis į lytines ir placentos audinių ląsteles. Tolesniuose diferenciacijos etapuose pliuripotentinės ląstelės virsta „audinių kamieninėmis ląstelėmis“, vadinamosiomis multipotentinėmis ląstelėmis. Šios ląstelės gali dalytis asimetriškai į vieną motininę kamieninę ląstelę ir kitą dukterinę ląstelę, kuri turi unipotentinį aktyvumą. Kamieninių ląstelių vystymosi procesas lengviausiai stebimas kraujodaros sistemoje. Visi kraujo ląsteliniai komponentai yra kilę iš nedidelės kraujodaros kamieninių ląstelių populiacijos, gebančios daugintis, atsinaujinti ir diferencijuotis į specifines ląstelių linijas. Vaisiaus hematopoezė prasideda maždaug 2-3 savaitę po apvaisinimo ir iš pradžių vyksta trynio maiše. Vaisiaus vystymosi metu kraujodara laipsniškai pereina į kepenis, o maždaug, 5-6 savaitę, kai išsivysto kaulai, vyksta kaulų čiulpuose. Multipotentinė hematopoetinė kamieninė ląstelė (HSC) visą gyvenimą asinchroniškai dalijasi į dvi dukterines ląsteles – vieną HSC ir vieną hematopoetinę pirmtakę ląstelę (HPC). HPC yra ankstyviausia pirmtakė ląstelė, kuri, skirtingai nei HSC, neturi galimybių savarankiškai atsinaujinti ir apsiriboja viena ar keliomis diferenciacijos linijomis ir yra pašalinama apoptozės būdu. Iš HPC gali susidaryti mieloidinės krypties ląstelė pirmtakė sudaranti granulocitų, eritrocitų, makrofagų ir megakariocitų populiacijas (CFU-GEMM) arba limfoidinė ląstelė pirmtakė (CFU-Lymph), kuri formuoja T ir B limfocitų bei NK ląstelių populiacijas (žr. 1 pav.) [1].



1 pav. Hematopoetinių ląstelių linijų susiformavimo schema (Dąbrowski ; Stojko and Witek; Yao et al. 2004) [1].

2. Virkštelės anatomija

Virkštelė, lotyniškai *Funiculus Umbilicalis*, tai siaura audinių gija, jungianti besivystantį embrioną su placenta. Žmogaus virkštelė iki gimimo yra maždaug 60 cm ilgio ir 1,3 cm skersmens. Virkštelėje yra dvi arterijos ir viena vena, apsuptos drebutinio (Wharton's Jelly) audinio, kurį daugiausia sudaro hialurono rūgštis ir išorinės membranos. Per virkštelę vaisiaus širdis pumpuoja kraują į placenta ir iš jos, vyksta maisto medžiagų ir atliekų mainai su motinos kraujotakos sistema. Virkštelės vena nešioja deguonies prisotintą kraują iš placentos į vaisių. Virkštelės arterijos išneša kraują su mažiau deguonies ir vaisiaus atliekas iš vaisiaus, perduoda placentai, kur jos yra apdorojamos motinos kūne (žr. 2 pav). Po gimimo virkštelė yra užsegama arba surišama, po to nupjaunama. Virkštelės pamatinė dalis, likusi prie kūdikio po kelių dienų nukrinta [2].



2 pav. Virškštelės anatomija ir zonos iš kurių gaunamos ląstelės [2].

Virškštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės

Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimas iš virškštelės kraujo (angl. *mesenchymal stem cells from umbilical cord blood (UCB-MSC)*) po gimdymo priklauso nuo kraujo tūrio bei laikymo laiko po surinkimo. Idealus surinktas kraujo tūris turėtų būti didesnis nei 80 ml, o laikymo trukmė neturėtų būti ilgesnė kaip 6 valandos. Išskirtos virškštelės kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės turi į fibroblastus panašią morfologiją ir gebėjimą diferencijuotis adipogenine, osteogenine ir chondrogenine kryptimis. Virškštelės kraujo mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdinga CD73, CD90 ir CD105 žymenų raiška, kuri mažėja joms diferencijuojantis.

Virškštelės dangalo mezenchiminės kamieninės ląstelės (angl. *Cord lining-mesenchymal stem cells (CL-MSC)*) pasižymi CD23, CD14 raiška ir nedidele CD34 ir CD35 raiška; nepasižymi endotelinio žymens CD31 raiška ir geriau proliferuoja *in vitro* nei drebutinio audinio mezenchiminės kamieninės ląstelės. Drebutinio audinio mezenchiminės kamieninės ląstelės nepasižymi CD14 ir CD23 raiška. Drebutiniame audinyje yra mažesnis MSC ląstelių tankis, tačiau didesnis jo kiekis leidžia greitai išskirti daug ląstelių. 5–10 mm³ dydžio Whartono drebučių gabale galima išskirti ir išauginti iki 1 milijardo MSC per 30 dienų. Žmogaus virškštelės perivaskulinės ląstelės yra beveik identiškos drebučių MSC. Išorinė virškštelės membrana yra nepaprastai turtingas kamieninių ląstelių šaltinis [3].

3. Virkštelės kraujas

Virkštelės kraujo kamieninės ląstelės išlieka didžiausiu potencialiu kamieninių ląstelių šaltiniu pasaulyje, atsižvelgiant į bendrą gimstamumą, kuris per metus siekia apie 135 milijonus. Taip pat virkštelės kraujas tampa vis patrauklesniu transplantacijos tyrimų objektu, nes šio kraujo ląstelės kelia mažesnę (angl. *graft-versus-host*) transplantacinės ligos tikimybę, bei yra galimybė naudoti negiminingus transplantatus (angl. *Unrelated donor (URD) cord blood*) [4]. Tyrimai rodo, kad virkštelės kraujo ląstelės yra mažiau aloreaktyvios nei kaulų čiulpų ląstelės, ir yra patrauklios ligoms gydyti (pvz., Fanconi anemija, aplastinė anemija, leukemija, medžiagų apykaitos ir kiti įgimti sutrikimai) [5]. 2010 metų duomenimis, pasaulyje per metus atliekama apie 3000 virkštelės kraujo ląstelių transplantų [6]. Iš vienos virkštelės apytiksliai išgaunama 60 ml kraujo. Virkštelės kraujyje yra gausu kraujodaros (hematopoetinių) kamieninių ląstelių (turinčių naivų imuninį statusą) ir ne hematopoetinių kamieninių ląstelių, kurios dar vadinamos virkštelės kraujo į embrionines panašiomis kamieninėmis ląstelėmis CBE (angl. *Cord Blood Embryonic-like stem cells*) [3]. Yra duomenų, kad virkštelės kraujo ląstelių transplantacijos gali iššaukti (nors ir mažesniu laipsniu nei naudojant kaulų čiulpų KL) GVH ligą („transplantantas prieš šeimininką“, angl. *Graft-Versus-Host Disease, GVHD*) [7]. Taip pat platų virkštelės kraujo naudojimą riboja palyginti mažas hematopoetinių kamieninių ląstelių kiekis vienetė: kai kuriais atvejais kraujo vienetų kamieninių ląstelių nėra pakankamai suaugusiesiems, tad yra poreikis kurti naujas technologijas ląstelių, išskirtų iš vieno donoro, padauginimui [6].

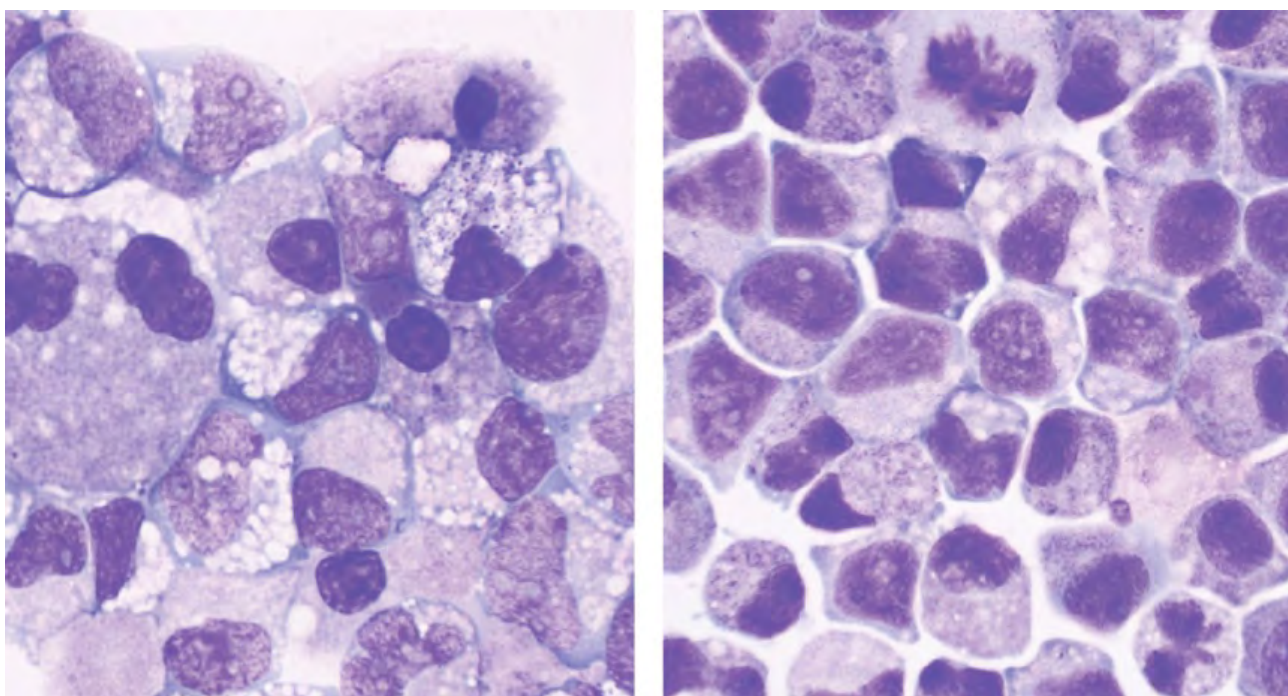
2017 m. duomenimis daugelyje kraujo bankų minimali ląstelių dozė yra 125×10^7 arba 150×10^7 branduolį turinčių ląstelių. Ląstelėms saugoti labai paplitęs automatizuoto užšaldymo būdas. Nauji būdai, kaip atšildyti virkštelės kraujo ląsteles transplantacijos centre, naudojant skiedimo ir neplovimo metodą, galėtų padidinti ląstelių atsigavimą. Virkštelės kraujo transplantacija yra gydomoji terapija pacientams, sergantiems leukemija, limfoma, mieloma, mieloproliferaciniais sutrikimais, genetinėmis ligomis ir medžiagų apykaitos sutrikimais. Virkštelės kraujas yra ypač svarbus ne Vakarų Europos-protėvių kilmės pacientams, nes šiems pacientams sunku rasti tinkamą donorą kaulų čiulpų donorų registre. Dvigubo virkštelės kraujo (t.y., dviejų kraujo vienetų) transplantavimo ir mažesnio intensyvumo režimų naudojimas padidino jų vartojimą vyresnio amžiaus pacientams ir sumažino su transplantacija susijusį mirštamumą. Pagrindiniai virkštelės kraujo transplantacijos iššūkiai, gydant hematologines ligas yra šie:

1. Persodinimas ir imuninės sistemos atstatymas vėluoja, todėl padidėja infekcijos rizika
2. Dviejų virkštelės kraujo transplantatų (dvigubo virkštelės kraujo persodinimo suaugusiesiems atveju) įsigijimo kaina gali būti 80 000 USD (labai brangu).

3. Pirminės ligos atkrytis išlieka pagrindine pacientų mirties priežastimi po transplantacijos.

Virkštelės kraujo hematopoetinių ląstelių morfologija

Žmogaus hematopoetinės kamieninės ląstelės – apvalios ląstelės su siaura citoplazma, kurioje mitochondrijos ir endoplazminis tinklas yra prastai vizualiai išreikšti. Šios ląstelės turi gebėjimą intensyviai daugintis, atsinaujinti bei diferencijuoti. HSC yra palaikomos ciklo G0 fazėje, neturi metabolinio aktyvumo ir beveik visiškai slopina baltymų sintezę, todėl šiek tiek dažosi fluorescenciniais dažais, tokiais kaip *Rhodamine 123*, *Hochest 33342*, arba *Pyronin Y*. Hematopoetinių ląstelių aktyvinimas siejamas su jų išėjimu iš G0 fazės į G1 fazę, kuriai būdingas transkripcijos aktyvinimas ir mRNR kaupimosi padidėjimas. Ląstelės, gautos iš ilgalaikių kultūrų, turi panašią morfologiją: jos yra didelės, apvalios, turinčios didelį ir apvalų branduolį ir nedidelį citoplazmos kiekį, kuris būdingas ir hematopoetinėms ląstelėms pirmtakėms [1].



3 pav. Hematopoetinių kamieninių ląstelių morfologija. Molekulė UM171 (kuri aktyvina subalansuotą prouždegiminį ir antiuždegiminį signalą per NFκB aktyvaciją ir baltymo C valdomą ROS detoksifikaciją) gali padidinti virkštelės kraujo kamieninių ląstelių skaičių. Kairėje neveiktos UM171, dešinėje paveiktos UM171 [8], [7], [9].

Virkštelės kraujyje aptinkamos kolonijas formuojančių ląstelių grupės

1 ml virkštelės kraujo yra apie 8000 primityvių eritroidinių pirmtakų (BFU-E) ląstelių, apie 13-24 000 mieloidinių pirmtakų (CFU-GM) ląstelių ir 1 000-1 0000 multipotentinių pirmtakų (CFU-GEMM). Virkštelės kraujo hematopoetinių pirmtakių ląstelių tankis labai panašus į kaulų čiulpų, bet yra ir skirtumų: virkštelėje randamas didesnis kiekis eritroidinių pirmtakų nei kaulų čiulpuose. Mieloidinių pirmtakų kiekis lyginant su kaulų čiulpais panašus, bet virkštelėje aptinkama daugiau nesubrendusių granulomonocitinių pirmtakų (žr. 1 lentelė). CFU-GEMM ląstelių virkštelės kraujyje daugiau nei kaulų čiulpuose. Virkštelės kraujyje randama primityvių ląstelių pirmtakių, kurios išaugina gausias kolonijas greitai proliferuojančių hematopoetinių ląstelių (HPP-CFC), taip pat aptinkamos ląstelės negebančios formuoti kolonijų pusiau kietose kultūrose, bet galinčių kolonijas formuoti po kelių savaičių Dexter-tipo ilgalaikėse kultūrose. Kolonijas formuojančių vienetų kiekis priklauso nuo citokinų kombinacijos naudojamos ląstelių kultivavimui [10].

Virkštelės kraujo ląstelių įsijungimas į kraujotaką ir išsivystymo iki neutrofilų vidutinis laikas yra daugiau kaip 25 dienos, o periferinio kraujo 20 ir mažiau dienų, kaulų čiulpų 24 ir mažiau dienų [11].

1 lentelė Virkštelės kraujo ir kaulų čiulpų hematopoetinių ląstelių kiekio palyginimas [11].

HPC/10 ⁵ branduolį turinčių ląstelių	Mieloidinės	Eritroidinės	Multipotentinės
Virkštelė	132±69	153±78	18±6
Kaulų čiulpai	160±58	155±67	5±3
Santykinė mieloidinių pirmtakų proporcija (%)	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
Virkštelė	33±9	40±12	29±8
Kaulų čiulpai	62±8	32±11	9±6
Santykinė eritroidinių pirmtakų proporcija (%)	CFU-E	BFU-E	
Virkštelė	7±8	94±11	
Kaulų čiulpai	35±15	62±16	

Imunofenotipas

Virkštelės kraujo hematopoetinės kamieninės ląstelės pasižymi CD34⁺ (glikoproteinas, hematopoetinių ląstelių adhezijos reguliatorius), tokių ląstelių virkštelės kraujyje yra apie 1 % iš visų branduolį turinčių ląstelių. Ši ląstelių populiacija heterogeniška, didžioji dalis taip pat

ekspresuoja HLA-DR ir CD38 antigenus. Subpopuliacijas galima atskirti pagal CD45RA ir CD71 raišką. CD34⁺CD45RA^{-low}CD71^{-low} yra CFU-GEMM ląstelės, CD34⁺ CD45RA⁺ CD71^{low} yra granulomonocitų pirmtakai, CD34⁺CD45RA^{low}CD71⁺ yra eritroidiniai pirmtakai. 60 % CD34⁺ ląstelių pasižymi *c-kit* proto-onkogeno raiška (CD117), 90 % – FLT3 (CD135) raiška. Taigi, dažniausias virkštelės kraujo kamieninių ląstelių fenotipas CD34⁺CD38⁻CD45RA^{low}CD71^{low} Thy-1⁺c-kit^{low}Rh^{low} [10].

2 lentelė Antigenų raiška virkštelės kraujo CD34⁺ ląstelėse [10].

Antigenas	Teigiamai pasižymėjusių ląstelių %	Antigenas	Teigiamai pasižymėjusių ląstelių %
CD13	70±13	CD54	>98
CD18	94±5	CD58	>98
CD19	4±2	CD71	30±9
CD33	78±12	CD90	40±16
CD38	97±2	CD115	5±1
CD44	>98	CD117	61±17
CD45RA	55±11	CD135	92±3
CD51	4±2	HLA-DR	89±8

Virkštelės kraujo kamieninių ląstelių plitimas ir proliferacija

In vivo biologinės ląstelių savybės priklauso nuo vidinių veiksnių ir citokinų esančių mikroapinkoje. *In vitro* proliferacija ir priauginimo galimybės priklauso nuo terpės, terpės keitimo dažnio, temperatūros, serumo buvimo/nebuvimo, ląstelių tankio ir kitų veiksnių. Primityvios CD34⁺ subpopuliacijos pasižymi didesniu ekspansijos potencialu, bet lėtesne proliferacija nei labiau diferencijavusios ląstelės. CD34⁺CD45RA^{low}CD71^{low} – ekspansijos potencialas didžiausias, o CD34⁺CD45RA^{low}CD71⁺ – didžiausia proliferacija. Eritroidiniai pirmtakai turi didžiausią proliferacijos potencialą (iš vienos ląstelės - 9×10⁶ ląstelių), makrofagų pirmtakų ekspansijos potencialas didžiausias - iki 9000 CD34⁺ ląstelių iš vieno pirmtako. Kultivuojant *in vitro* svarbu kokie citokinai bus kultūroje: svarbūs SCF, interleukinas1 (IL-1), IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, eritropoetinas (Epo), trombopoetinas (Tpo) ir FL. Didžiausia ekspansija stebima kai įdedama anksti veikiančių faktorių SCF, FL, Tpo. Vėlai veikiantys faktoriai padeda gauti daugiau subrendusių ląstelių [10]. Hematopoetiniai inhibitoriai tokie kaip: TGF-β, TNF-α, ir makrofagų uždegiminis baltymas-1α reikšmingai sumažina ląstelių CD34⁺ ekspansiją ir proliferaciją, todėl šiam efektui pašalinti kultivuojant ląsteles gali būti naudojami antitransformuojantis augimo faktoriaus-β monokloninis antikūnas su stimuliaciniais

citokiniais. 97 % virkštelės kraujo CD34⁺HLA-DR⁺ ląstelių kultūros iniciacijos metu yra G0/G1 fazėje. Po 36 valandų inkubacijos 55 % ląstelių lieka G0/G1 ciklo fazėje. 88 % kaulų čiulpų CD34⁺HLA-DR⁺ ląstelių kultivavimo pradžioje yra G0/G1 fazėje, o po 36 valandų 72 % tokių ląstelių. Virkštelės kraujo plazmoje aptinkama daugiau citokinų nei kraujo plazmoje, dėl to šios ląstelės stimuliuojamos ir greičiau išsina iš G1/G0 fazės. Ląstelių chromosomų galų telomeriniai pasikartojimai (TTAGGG)_n su kiekvienu ląstelės pasidalijimu trumpėja apie 50-100 bp. Virkštelės kraujo ląstelės prieš kultivaciją turi ~12 kb ilgio telomerinius fragmentus, o kaulų čiulpų ~8 kb ilgio telomerinius TRF fragmentus. 25 dienas kultivuojant telomeros sutrumpėja 1,5 kb ir kaulų čiulpų ir virkštelės kraujo ląstelėse [10].

3 lentelė Ex vivo virkštelės kraujo CD34⁺ ląstelių ekspansija. Rezultatai pateikti kaip santykinės ekspansijos CFC ir CD34⁺ vidurkis skystose kultūrose papildytose citokinų kombinacijomis E = Epo; G = G-CSF; M = M-CSF; PX = PIXY-321. CFC- kolonijas formuojančios ląstelės [10].

Ląstelės	Citokinai	Dienos	CFC ekspansija	CD34 ⁺ Ekspansija
CD34 ⁺	SF, IL-3	30	5,000	nėra žinoma
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3	42	160	nėra žinoma
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3, IL-6	28	10	nėra žinoma
CD34 ⁺	SF, IL-1, IL-3, E	21	2,364	nėra žinoma
CD34 ⁺	FL, TPO	175	2 × 10 ⁶	146,000
CD34 ⁺ 4HC ^{res}	SF, IL-3	7	92	nėra žinoma
CD34 ⁺ HLA-D R ⁺	SF, IL-3	5	10	nėra žinoma
CD34 ⁺ Rh ^{bright}	SF, E	7	2.5	nėra žinoma
CD34 ⁺ Rh ^{low}	SF, E	7	94	nėra žinoma
CD34 ⁺ 45RA ⁻ 71-Thy-1 ⁻	SF, IL-6, PX, G, M, E	40	241	900
CD34 ⁺ 45RA ⁻ 71-Thy-1 ⁺	SF, IL-6, PX, G, M, E	40	4,719	32,000

In vivo tyrimai

SCID pelėse transplantavus su žmogaus virkštelės kraujo kamieninėmis ląstelėmis, pelių kraujotakoje pradėjo gamintis mieloidinės ir limfoidinės žmogaus kilmės ląstelės. Tai rodo, kad įvyko kamieninių ląstelių implantacija. Buvo nustatyta, kad žmogaus citokinai nedaro įtakos virkštelės kraujo kamieninių ląstelių prisitaikymui pelių organizme. Tuo tarpu persodinus kaulų čiulpų ląsteles ir pridėjus žmogaus citokinų matomas didelis kamieninių ląstelių prisitaikymo pelės organizme pagerėjimas. Tai rodo, kad virkštelės kraujo ląstelės pačios išskiria citokinus ir joms nereikia jų papildomai pridėti. Virkštelės kraujo kamieninės ląstelės yra geresnis taikyns

genetinėms manipulacijoms ir genų pernašai nei kaulų čiulpų ląstelės ir galėtų būti taikomos genų terapijai [10].

4. Metodai: virkštelės kraujo išskyrimas ir hematopoetinių kamieninių ląstelių išskyrimas ir dauginimas

Kraujo surinkimas

Virkštelės kraujas, kuris paprastai yra utilizuojamas, yra lengvai surenkamas gimdymo metu, nesukeliant pavojaus ir nepatogumų donorui ar motinai [12]. Surinkti virkštelės kraują galima atliekant virkštelės venos punkciją: 1) placentai vis dar esant gimdoje arba 2) po pačios placentos pasišalinimo iš moters organizmo. Pirmuoju metodu kraują padeda surinkti gimdos susitraukimai, todėl procedūra turi būti atliekama greitai ir steriliai, kadangi yra rizika užkrėsti virkštelės kraują motinos krauju ar mikroorganizmais. Antrasis metodas gali sumažinti taršos tikimybę, tačiau yra tikimybė, kad virkštelės vena bus nebetinkama kraujui surinkti (subliūkš). Kad kraujas nesukrešėtų, naudojami heparinas ir ACD (rūgštis, citratas, dekstrozė); neseniai buvo įrodyta, kad CPD (citratas, fosfatas, dekstrozė) mažiau priklausomas nuo surinkto kraujo tūrio pokyčių, todėl yra pranašesnis virkštelės kraujo surinkimui [5].

Ląstelių išskyrimas ir atskyrimas į populiacijas

Pagal He et al, 2005. Vienbranduolės ląstelės iš šviežio (< 8 val. nuo gimimo) kraujo buvo išskirtos standartiniu Histopaque (Sigma) tankio gradientu. CD34⁺ ląstelės buvo praturtintos naudojant tiesioginį CD34 pirmtakų ląstelių išskyrimo rinkinį (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) pagal gamintojo instrukcijas. Trumpa protokolo versija: 1x10⁸ vienbranduolių ląstelių buvo suspenduota 300 µl atskyrimo buferio, sudaryto iš: PBS, papildyto 2 mM EDTA ir 0,5 % BSA, 100 µl žmogaus FcR blokuojančio antikūno ir 100 µl monokloninių „MicroBeads“ ir buvo inkubuojami 30 min. 6 - 12 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos 15 ml atskyrimo buferio, pakartotinai suspenduojamos 1 ml atskyrimo buferio, perleidžiamos per 30 um nailoninį tinklėlį ir atskiriamos kolonėlėje, MACS prietaiso magnetinio lauko principu. Kolonėlė tris kartus plaunama 3 ml buferio ir surenkamos visos ištekančios ląstelės. Šios ištekančios ląstelės buvo CD34⁺ branduolį turinčios virkštelės kraujo ląstelės. Kolonėlė buvo pašalinta iš magnetinio separatoriaus, o sulaikytos ląstelės buvo išplautos naudojant 5 ml atskyrimo buferio, naudojant stūmoklį. Ląstelių mėginiai buvo dažyti anti-CD45-PE (Coulter, Majamis, FL) ir anti-CD34-FITC (Becton Dickinson, San Chosė, CA) tėkmės citotometrinei analizei atlikti. Eliuotos ląstelės buvo tiriamos fluorescenciniu ląstelių rūšiavimu (FACS). Tada CD34⁺ praturtintos ląstelės buvo inkubuotos su anti-CD34-FITC ir anti-CD133-PE (Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

CD34⁺CD133⁺ populiacijos buvo išgrynintos FACStar tėkmės citometru (Becton Dickinson, San Chosè, CA) [4].

Pagal Chivu et al, 2004. Kraujas buvo renkamas pagal institucines gaires, normalių gimdymų metu, naudojant citrato fosfato dekstrozės adeniną kaip antikoagulantą. Vienbranduolės ląstelės buvo atskirtos Histopaque (Sigma); tankio gradientas = 1,007 g/ml, pakartotinai suspenduotos Iscove modifikuotoje Dulbecco terpėje (IMDM) ir suskaičiuotos. **Padauginimas kultūroje.** Vienbranduolės ląstelės buvo suspenduotos terpėje be serumo 2 x 10⁶ ląstelių mililitre tankiu. Terpės sudėtis buvo tokia: Dulbecco terpė papildyta 1 % BSA (Merck), 5 x 10⁻⁴M 2-merkaptoetanolio, 1 % nepakeičiamų aminorūgščių (Gibco Life-Sciences), 2 mM L-glutamino ir šviežiai ištirpinto 10⁻⁶ M hidrokortizono. Ląstelių suspensija išsėta į 24 šulinėlių plokšteles (1ml/šulinėlyje) ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5% CO₂. Norint ištirti rekombinantinių citokinų poveikį *ex vivo* ląstelių padauginimui, kultūros taip pat buvo papildytos kraujodaros augimo faktoriais. Visi žmogaus augimo faktoriai buvo naudojami esant tokiai koncentracijai padėjo gauti didžiausią ląstelių proliferaciją titravimo eksperimentuose: 10 ng/ml interleukino 6 (Chemicon), 20 ng/ml G-CSF (Hoffmann - La Roche) ir 2 V/ml eritropoetino (Hoffmann - La Roche) [13]. Antrasis augimo kokteilis [14] buvo pagrįstas 20 % placentos kondicionuota terpe (PCM) ir 2 % autologine plazma. Ląstelių kultūra buvo sudaryta iš suardyto tripsinu placentos audinio. 1,5×10⁶ ląstelių buvo išsėta į 75 cm² flakonus Dulbecco MEM:F12 terpėje (Sigma) su 10% NCS, 400 UI/ml penicilino, 200 µg/ml streptomicino. Reguliarūs persėjimai buvo atliekami du kartus per mėnesį, santykiu 1:2. Supernatantas buvo surenkamas, centrifuguojamas 500 g, filtruojamas per 0,22 µm membraną, padalijamas į dalis ir užšaldomas -200 °C temperatūroje. Ląstelių branduolių ir gyvybingų ląstelių skaičius įvertinamas naudojant tripano mėlio testą. **Maitinantis sluoksnis.** Buvo sukurta ilgalaikė kaulų čiulpų kultūra, naudojant pelių kaulų čiulpų ląsteles. Čiulpai buvo sumaišyti 1:1 tūriu PBS, o vienbranduolės ląstelės buvo atskirtos centrifuguojant tankio gradientu. Išplautos ląstelės buvo pakartotinai suspenduotos stromos terpėje: F12 terpėje (Sigma) su 10 % FBS, 400 UI/ml penicilino, 200 mg/ml streptomicino ir 1,0 µmol/l hidrokortizono. Ląstelės buvo palaikomos 37 °C ir 5 % CO₂. Pusė terpės buvo keičiama du kartus per savaitę. Po dviejų savaičių ląstelės iš sulipusių sluoksnių buvo išgaunamos suardant tripsino-EDTA tirpalu (Sigma-Aldrich) ir perkeltos į šešių šulinėlių plokšteles tolimesniems eksperimentams. Kultūros buvo inkubuotos 37 °C temperatūroje 5 % CO₂. Kai buvo suformuotas stromos sluoksnis, kultūros buvo valomos 20 µg/ml mitomicino C (Sigma) 4 valandas, po to intensyviai plaunamos, kad būtų pašalintas vaistas. Pabaigoje ląstelės buvo gyvybingos ir metaboliškai aktyvios, tačiau blokuotos ląstelės cikle. Norint ištirti stromos įtaką *in vitro* proliferacijai, mikroporinės membranos (0,4 µm, Nunc), kurios neleidžia ląstelėms migruoti, tačiau praleidžia tirpius veiksnius, pavyzdžiui,

chemokinus, buvo naudojamos virkštelės kraujo ląstelėms atskirti nuo stromos maitinančių ląstelių. 2×10^6 vienbranduolių ląstelių mililitre buvo dedama į aukščiau aprašytą terpę, kurioje nėra serumo, ir palaikoma kultūroje tris dienas [13].

Pagal Almici et al 1995. Fizinis vienbranduolių ląstelių atskyrimas ir raudonųjų kraujo kūnelių šalinimas sukelia ląstelių pirmtakių praradimą, todėl iki šiol virkštelės kraujo banko rekomendacija buvo užšaldyti visą virkštelės kraują be frakcionavimo. Vėliau, buvo išbandyta speciali atskyrimo procedūra naudojant sedimentaciją želatinoje, gauti geri rezultatai. Sėkmingas apvalymas nuo eritrocitų ir kamieninių ląstelių atsigavimas gautas naudojant sedimentaciją per poligelį (poligeline). Darbas su poligeliu yra lengvas ir saugus, nes poligelio tirpalas yra paruoštas, standartizuotas komercinis reagentas (Emagel, Behringwerke, Marburg, Vokietija), skirtingai nei želatina, kuri gaunama miltelių pavidalo, todėl prieš naudojimą ją reikia paruošti ir autoklavuoti. Sedimentacija per želatiną arba poligelį leidžia efektyviai atskirti eritrocitus nepažeidžiant kamieninių ląstelių. Šios atskyrimo procedūros leidžia sumažinti mėginių, kuriuos reikia užšaldyti, tūrį, sumažinant laikymo vietos ir saugojimo išlaidas [5].

Užšaldymas

Dažniausiai užšaldymui naudojamas dimetilsulfoksidas (DMSO), o šaldymas atliekamas kompiuterizuotame kontroliuojamo greičio šaldiklyje. Sušaldytos ląstelės laikomos skystame arba garų fazės azote. Šaldymas neturi įtakos ląstelių atsigavimui ir kolonijų formavimui, saugant iki 7 metų. Ląstelių atsigavimas po šaldymo – CFU-GEMM 94%, BFU-E 82% CFU-GM 90% ilgalaikėje kultūroje [5].

Optimizuota terpė virkštelės hematopoetinių kamieninių ląstelių padauginimui

Optimali serumo pakaitalų ir citokinų kokteilio hematopoetinių kamieninių ląstelių padauginimui kultūroje sistemoje kompozicija yra: Iscove modifikuota Dulbecco terpė papildyta BIT (4g/l BSA, 0,71μg/ml insulino ir 27,81μg/ml transferino) ir CC-9 (5,53ng/ml TPO, 2,03 ng/ml IL-3, 16 ng/ml SCF, 4,43 ng/ml FL, 2,36 ng/ml IL-6, 1,91 ng/ml G-CSF, 1,56 ng/ml GM-CSF, 2,64 ng/ml SCGF ir 0,69 ng/ml IL-11). Po 6 dienų auginimo absoliutus baltųjų kraujo kūnelių, CD34⁺ ląstelių, CD34⁺CD38⁻ ląstelių, kolonijas formuojančių ląstelių ir ilgalaikes kultūras inicijuojančių ląstelių (LTC-IC) padidėjimas buvo atitinkamai 1,4; 30,4; 63,9; 10,7 ir 2,8 karto [15].

Ląstelių padauginimas: metodų trūkumai ir privalumai

Tirpių veiksmių panaudojimas. Nustatyta, kad purino darinys, vadinamas SR1, žymiai padidina žmogaus virkštelės kraujo hematopoetinių ląstelių CD34⁺ kiekį kultūroje. Parodyta, kad SR1 penkiasdešimt kartų padidina CD34⁺ ląstelių kiekį ir 17 kartų padidina ląstelių, kurios geba įsitvirtinti imunodeficitinėse pelėse kiekį. SR1 yra arilo angliavandenilių branduolinio receptoriaus baltymo (AhR) antagonistas, susijęs su kraujodaros kamieninių/pirmtakinių ląstelių reguliavimu. AhR pašalinimas lemia nuolatinį CD34⁺ ląstelių dauginimąsi kultūroje. Tačiau SR1 nėra efektyvus vienas įdėtas į kultivavimo terpę. Geri rezultatai gauti terpėje be serumo, papildytoje keturiais citokiniais: trombopoetinu (Tpo), kamieninių ląstelių faktoriumi (SCF), Flt3 ligandu ir IL-6. Yra ir kitų naudojamų veiksmių terpėms papildyti: SCF, Tpo, FGF-1 ir IGFBP2 kokteilis; Notch ligandai, Wnt, kaulų morfogeniniai baltymai, IGF-2, pleotrofinas ir prostaglandinas E2, bet nei vienas jų neveikia įdedamas į terpę tik vienas, reikia naudoti kelių praturtinančių veiksmių kombinaciją [6].

Analizuojant įvairius protokolus, kurie naudojami hematopoetinėms kamieninėms ląstelėms padauginti išsiaiškinta, kad dažniausiai ląstelių porūšiai atskiriami prieš kultivimą. Dauguma tyrimų prasideda CD34⁺ arba CD133⁺ ląstelių išskyrimu panaudojant magnetinius karoliukus. Minėtose ląstelių populiacijose yra aptinkama dauguma kraujodaros pirmtakinių ląstelių ir ilgalaikes kultūras palaikančių hematopoetinių kamieninių ląstelių, kurios būtinos sėkmingai klinikiniam transplantavimui. Išankstinis CD34⁺ arba CD133⁺ ląstelių atskyrimas padidina ląstelių proliferaciją *ex vivo*, greičiausiai dėl to, kad nėra subrendusių ląstelių ar ne hematopoetinių ląstelių, galinčių slopinti hematopoetinių kamieninių ląstelių dauginimąsi. Darbas su išgrynintomis ląstelių populiacijomis taip pat palengvintų galimą genų terapiją, kai reikia parinkti hematopoetines kamienines ląsteles, kuriose transgenas buvo įterptas į norimą chromosomos vietą. Kita vertus, CD34⁺ arba CD133⁺ ląstelių izoliacija turi keletą galimų trūkumų, ypač turint mintyje, kad daugelis hematopoetinių kamieninių ląstelių, esančių virkštelės kraujyje, gali būti prarastos per frakcionavimo procesą. Ląstelių praradimas iš dalies gali būti susijęs su nesugebėjimu surinkti norimas ląsteles, nes teigiama atranka visada lemia ląstelių praradimą dėl neefektyvaus surišimo su magnetiniais rutuliukais, o kai kurios hematopoetinės kamieninės ląstelės gali nepasižymėti pakankama CD34 ar CD133 žymenų raiška, kad būtų galima jas atsirinkti kaip tikslines ląsteles. Netyčinis tikslinių ląstelių praradimas taip pat gali būti dėl ląstelėms sukeliama streso ir mirties atliekant įvairius manipuliavimo veiksmus. Atrinkant ląsteles pagal antigenus kyla problemų, nes 1) prikabinti antikūnai lieka ant ląstelių ir

yra pernešami į paciento organizmą, 2) eritrocitai gali žymėtis nespecifiškai. Vienas iš būdų panaikinti šiuos apribojimus yra naudoti neigiamo išsikvojimo (*angl. negative depletion*) metodą, kad būtų pašalintos ne hematopoetinės kamieninės ląstelės, o diferencijuotos ląstelės. Neigiamo išsikvojimo metodai taip pat turėtų sumažinti hematopoetinių kamieninių ląstelių praradimą, lyginant su teigiama selekcija [6].

Kokultūros. Be įvairių tirpių veiksnių derinių, keliuose aprašytuose hematopoetinių kamieninių ląstelių padauginimo protokoluose atliekamas auginimas kartu su mezenchiminių kamieninių/stromos ląstelių linijomis. Šis metodas turi keletą pranašumų, ypač tai, kad CD34⁺ arba CD133⁺ ląstelių izoliacija prieš kultivavimą nereikalinga. Nepaisant to, mažai įrodymų, kad bendra mezenchiminių kamieninių ląstelių kultūra palaiko ilgalaikę hematopoetinių kamieninių ląstelių kultūrą, nors kokultūros sąlygos padidina kraujodaros pirmtakinių ląstelių skaičių. Be to, keliama reikalavimai, susiję su klinikinio lygio mezenchiminių kamieninių ląstelių gamyba ir kokybės kontrole pagal geros gamybos protokolus (GMP), trukdys naudoti šias ląsteles, taip pat neišvengiama kyla rizika pacientui dėl netyčinės maitinamųjų ląstelių infuzijos, gali būti sukeliama didesnė imuninė reakcija į transplantą. Be hematopoetinių kamieninių ląstelių, sėkminguose transplantuose turi būti mažiau primityvių (labiau diferenciuotų) kraujodaros pirmtakų, kad pirmosiomis savaitėmis po transplantacijos būtų suformuotos subrendusios mieloidinės ir limfoidinės ląstelės. Imuninės ląstelės, tokios kaip T ląstelės transplantate, taip pat vaidina svarbų vaidmenį implantacijos procese. Klinikiniu tyrimu parodyta, kad Notch signalinio kelio skatinimas žmogaus CD34⁺ pirmtakų *ex vivo* ekspansijos metu, žymiai padidino absoliutų kamieninių ląstelių skaičių. Infuzijos metu pacientams neutrofilų atsigavimo laikas buvo žymiai sutrumpintas. Šis atradimas yra svarbus, nes vėlyvas ląstelių prigijimas gali sukelti didesnę infekcijos dažnį, o tai yra viena pagrindinių mirštamumo priežasčių po transplantacijos [6].

4 lentelė Tiriama įvairūs metodai hematopoetinių kamieninių ląstelių prisitaikymui transplantacijos metu ir imuninio atsako atstatymui gerinti [16].

Agentas/Strategija	Mechanizmas	Autorius	Tirtų atvejų kiekis (n)	Dienos iki absoliutaus neutrofilų kiekio >500
Nikotinamidas	Slopina fermentus, kuriems reikia NAD+	Horwitz et al.	11	13
Notch	Slopina diferenciaciją	Delaney et al.	10	16
Mezenchiminės kamieninės ląstelės	Pagerina sromą	De Lima et al.	31	15
Prostaglandinas E2	Homingas	Cutler et al.	12	17
Fukosiltransferazė-VI	Fukosilinimas	Popat et al.	7	14
Sitagliptinas	Dipeptidil peptidazės-IV slopinimas	Faragan et al.	24	21
Kaulų čiulpai	Homingas	Kurita et al.	15	17

Klinikinės strategijos pagerinti virkštelės kraujo transplantų ekspansiją ir homingą [11]

1. *Ex vivo* ekspansija (gausinimas)

- Hematopoetiniai citokinai skystoje kultūroje. SCF, TPO, ir FLT-3L yra geriausias kokteilis hematopoetinių kamieninių ląstelių kultūros palaikymui, o citokinai IL-3, IL-6, IL-11 ir G-CSF greitai indukuoja ląstelių diferenciaciją. Diferencijuotų ląstelių išskiriami augimo veiksniai mažina kamieninių ląstelių gebėjimą atsinaujinti. Nauji hematopoetinių kamieninių ląstelių kultūroms auginti panaudojami augimo veiksniai: IGFBP-2, Angptl baltymai ir pleiotrofinas.

- Kokultūros su mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis atkuria kaulų čiulpų mikroapliną. Alogeninės kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės pašalina poreikį atlikti kamieninių ląstelių atranką ir kontroliuoja hematopoetinių kamieninių pirmtakinių ląstelių gyvybines funkcijas per ląstelė-ląstelė kontaktus ir baltymų sekreciją.

- Cheminės molekulės ir baltymai, kurie reguliuoja hematopoetinių kamieninių ląstelių signalinius kelius. Naudojami tetraetilenopentaminas TEPA (vario chelatas), NAM (sirtuino 1 slopliklis), SR1 ir imobilizuotas delta-1 (Notch ligandas).

- Bioreaktoriai ir prietaisai leidžiantys palaikyti pastovią kultūros perfuziją. Didelio masto ekspansija, kuri palaiko optimalią citokinų koncentraciją ir sumažina slopliklių poveikį.

2. Homingas

- Inhibicija. Naudojama CD26/dipeptidilpeptidazė IV (DPP-4). Chemotaksio pakeitimas per DPP-4 fermentinį kirpimą SDF-1 molekulėje.

- Komplemento sistemos fragmento 3a (C3a) praimingas. Leidžia kalciui efektyviau patekti į CD34+ ląsteles.

- Dimetil-prostaglandinas E2. Reguliuoja Wnt signalinį kelią per β -katenino degradaciją ir padidina CXCR4 raišką.

- Fukosilinimas

3. Kitos klinikinės strategijos

- Pasirinkti kraujo mėginį su dideliu branduolį turinčių ląstelių kiekiu ir optimaliu HLA sutapimu.

- Pagerinti metodus kraujo surinkimui ir minimalizuoti ląstelių praradimą. Placentos perfuzija padidina surenkamų ląstelių kiekį, bet reikalauja specializuotos technikos, kad būtų galima ją atlikti.

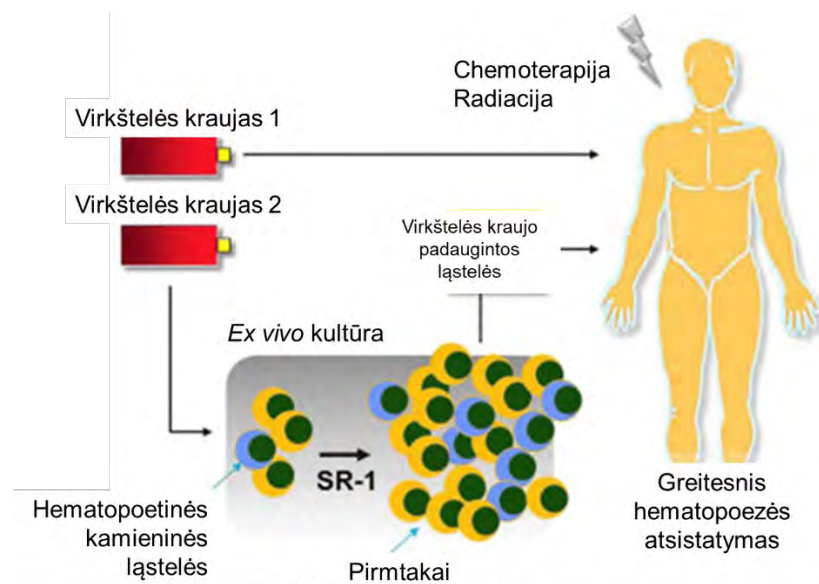
- Padidinti branduolį turinčių ląstelių skaičių naudojant arba du virkštelės kraujo vienetus, arba vieną vieneta kartu su CD34+ ląstelėmis. Dvigubi kraujo vienetai arba CD34+ ląstelių infuzija pagerina virkštelės kraujo ląstelių įsisavinimą, tačiau reikalingas sudėtingas HLA suderinimas su galimai padidėjusiu GVHD dažniu.

- Infuzija su papildomomis ląstelėmis, tokiomis kaip alogeninės virkštelės kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės. Pagerina persodintų hematopoetinių kamieninių ląstelių pirmtakių įterpimą sukuriant tinkamą mikroaplinką ir palengvinant GVHD požymius.

- Brandžių imuninių ląstelių, gautų iš dalies ar viso virkštelės kraujo vieneto, infuzija. Galėtų mažinti komplikacijas po transplantacijos, tokias kaip atkrytis, infekcijos ir GVHD [11].

5. Klinikiniai tyrimai

Pagal Wagner et al, 2016. Atlikti I ir II fazės klinikiniai transplanto tyrimai rodo, kad SR1 padidina virkštelės kraujo hematopoetinių kamieninių ląstelių kiekį. SR-1 lemia CD34+ hematopoetinių kamieninių pirmtakių ląstelių kiekio padidėjimą kultūroje. 17 pacientų su hematologine liga gavo SR1 pagalba padaugintų virkštelės kraujo ląstelių. SR-1 padaugintos ląstelės buvo suleistos kartu su antruoju nepadaugintų virkštelės kraujo ląstelių vienetu. SR-1 ekspansija pagerino neutrofilų (vidutiniškai 15 dienų) ir trombocitų (vidutiniškai 49 dienos) atkūrimą lyginant su kontrolėmis [17].



4 pav. Wagner atlikto klinikinio tyrimo schema. Pacientams gydyti naudoti du virštelės kraujo vienetai, vienas vienetas nemodifikuotas, o kitas - ląstelės padaugintos *ex vivo* naudojant agentą SR1 [17].

Pagal Cornelissen ir Blaise 2016. Atlikta virštelės kraujo hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija pacientams, sergantiems ŪML, pasiekta pirmoji visiška remisija. Nustatytas šiek tiek didesnis transplantacijos nesėkmės dažnis lyginant su kaulų čiulpų ląstelėmis, dažniausiai siejamas su per mažu ląstelių kiekiu. Ištyrus 1500 pacientų nustatyta, kad virštelės kraujo transplantacijos turi didesnę pirminės nesėkmės dažnį t.y. ląstelės dažniau neprigija, bet mažesnę atkryčio ir GVHD tikimybę lemia panašų išgyvenimą be leukemijos (*angl. leukemia-free survival*). Naudojant dviejų virštelėlių kraują nustatyta mažesnė tikimybė, kad ląstelės neprigys, bet šiek tiek stipresnė GVHD liga, padaryta išvada, kad geriau naudoti vieno virštelės vieneto ląsteles, jei tik ląstelių yra pakankamai [18].

Pagal Rocha ir Gluckman, 2006. Pirma sėkminga virštelės kraujo ląstelių transplantacija atlikta 1989 metais, o nuo 1998 m. 20 % transplantacijų jaunesniems nei 20 metų pacientams atliekama naudojant virštelės kraują. Naudojant virštelės kraują iš negiminingo donoro, esant skubiam transplantacijos poreikiui galimas 1-2 HLA neatitikimas. Duomenys rodo, kad negiminingo donoro virštelės kraujo ląstelių transplantatas turėtų būti laikomas priimtiniu variantu vaikams ir suaugusiesiems, turintiems hematologinių ir nehematologinių piktybinių navikų, kuriems HLA-suderinamas negiminingas kaulų čiulpų donoras nėra lengvai prieinamas. Trumpesnis transplantacijos laikas ir geresnė tikimybė rasti tinkamą transplantatą yra akivaizdūs negiminingo donoro virštelės kraujo pranašumai prieš negiminingo donoro kaulų čiulpų

transplantą. Tai ypač aktualu pacientams, kuriems reikia skubios transplantacijos. Padidinus turimą virkštelės kraujo vienetų skaičių padidėtų tikimybė rasti tokį, kuriame būtų daugiau ląstelių ir mažiau HLA skirtumų. Tai yra būdas pagerinti virkštelės kraujo transplantacijos rezultatus. Giminingų donorų virkštelės kraujo transplantacija dažniausiai atliekama vaikams. Vaikų po giminingo donoro virkštelės kraujo transplantacijos, 3 metų išgyvenamumas yra $47\% \pm 5\%$ piktybinių navikų atveju ($n=96$), $82\% \pm 7\%$ pacientų, sergančių kaulų čiulpų nepakankamumu ($n=33$), 100% pacientų, kuriems nustatyta hemoglobinopatija ($n=52$). Buvo palyginti 113 vaikų, gavusių virkštelės kraują iš HLA-tapačių seserų/brolių, rezultatai su 2052 vaikų, kuriems buvo atliktas HLA-tapačių brolių ir seserų kaulų čiulpų transplantacija (BMT), rezultatais. Virkštelės kraują gavusiems pacientams nustatytas lėtesnis neutrofilų ir trombocitų atsigavimas ir mažesnė ūminio ir lėtinio GVHD rizika. Mirčių, susijusių su atkryčiu, per 100 dienų po transplantacijos ir bendras išgyvenimas reikšmingai nesiskyrė tarp dviejų grupių. Taip pat tyrimai parodė, kad negiminingo donoro virkštelės kraujo transplantavimas vaikams sugebėjo atkurti hematopoezę ir pasiekti ilgalaikį ląstelių įsisavinimą, ir daugeliu atvejų buvo susijęs su mažu GVHD dažniu ir didesnės atkryčio rizikos nesudarė. Beveik visos nesusijusių donorų vaikų virkštelės kraujo transplantacijų serijos parodė didelę ląstelių dozės svarbą transplantacijai ir išgyvenimui. Išanalizavus iš viso 323 vaikus sergančius ūmine limfoblastine leukemija, kuriems 1994–2004 m. buvo taikoma virkštelės kraujo transplantacija: vidutinis amžiaus vidurkis buvo 6,5 metų, vidutinė infuzuota ląstelių dozė buvo $4,1 \times 10^7$ ląst./kg, o stebėjimo trukmės mediana 22 mėnesiai. Iš viso 2 metų išgyvenamumas be leukemijos buvo $36\% \pm 3\%$. Taip pat buvo palyginti 113 suaugusių pacientų, sergančių hematologinėmis piktybinėmis ligomis, kuriems buvo taikytas negiminingas kaulų čiulpų transplantavimas ($n=45$) arba negiminingas virkštelės kraujo transplantavimas ($n=68$). Laikas nuo donoro paieškos iki transplantacijos buvo žymiai trumpesnis tarp virkštelės kraują gavusių asmenų (mediana, 2 mėnesiai), kai kaulų čiulpų recipientų (11 mėnesių). Virkštelės kraują gavusiems pacientams buvo nustatytas lėtesnis neutrofilų ir trombocitų atsigavimas. Virkštelės kraują gavusiems pacientams po transplantacijos buvo greičiau mažinamas imunosupresantų vartojimas, o ūminis GVHD gydymas steroidais buvo retesnis. Be to, nė vienas virkštelės kraujo gavėjas nuo GVHD nemirė, nepaisant didelio HLA neatitikimo. Išgyvenimas be ligos buvo geresnis po virkštelės kraujo, nei po kaulų čiulpų transplanto. Šiame tyrime virkštelės kraujo ląstelių dozė buvo $> 2 \times 10^7/\text{kg}$ [19].

Pagal Pineault ir Abu-Khader 2015. Virkštelės kraujo hematopoetinių kamieninių ląstelių padauginimas naudojant ankstyvo veikimo citokinus padaugina hematopoetines kamienines ląsteles su trumpalaikiu implantacijos gebėjimu (*angl. short-term engraftment*), bet ne ilgalaikiu

implantacijos gebėjimu, todėl klinikiniuose tyrimuose naudojant tokias ląsteles gaunami prasti rezultatai. Naujausi tyrimai sinergiškai naudojant citokinus ir hematopoetinių kamieninių ląstelių pirmtakų ekspansijos antagonistus pagerino klinikinius rezultatus. Molekulės, kurios skatina homingą gali padėti ląstelių padauginimui ir jų pritaikymui terapijai. *Ex vivo* hematopoetinių pirmtakinių kamieninių ląstelių padauginimas turėtų paspartinti hematopoezės atsistatymą, nes būtų įleidžiamas didesnis multipotencinių ir jau nusprendusių kurią linija diferencijuostis pirmtakų kiekis, taigi sutrumpėja laikas, reikalingas suformuoti funkcionalias subrendusias ląsteles. Ankstyvieji tyrimai su pelėmis rodo, kad padaugintos *ex vivo* hematopoetinės kamieninės ląstelės pirmtakės greičiau generuoja diferencijuotas ląsteles nei nedaugintos [20].

6. Patentai

Žmogaus hematopoetinių kamieninių ląstelių identifikavimas ir išskyrimas (angl. Identification and isolation of human hematopoietic stem cells US5643741A)

Ištyrus kamienines ląsteles, galima nustatyti augimo veiksnius, susijusius su jų atsinaujinimu. Be to, gali būti dar neatrastų augimo veiksnių, susijusių 1) su ankstyvuju kamieninių ląstelių diferenciacijos polinkiu tam tikrai linijai; 2) linijos apsisprendimu ir 3) neigiama kamieninių ląstelių dauginimosi kontrole. Kamieninės ląstelės yra svarbūs genų terapijos taikiniai, be to, gebėjimas išskirti kamienines ląsteles gali būti naudingas gydant limfomas ir leukemijas, taip pat kitas neoplastines ligas, pvz., krūties vėžį.

Šiame patente pateikiami metodai, skirti atskirti homogeniškas žmogaus hematopoetinių kamieninių ląstelių linijas. Metoduose naudojami iš anksto nustatyti išskyrimo metodai, siekiant nustatyti kiekvienos hematopoetinės ląstelių linijos generaciją iš izoliuotų ląstelių. Ląstelėms atpažinti naudoti antikūnai prieš įvairius žymenis: CD3, CD8, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33 ir CD34, CD33. CD3, CD8, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20 ir CD33 buvo FITC junginiai. FACS analizė ir rūšiavimas: buvo naudojamas „Becton-Dickinson“ FACS, modifikuotas taip, kaip aprašyta (Parks and Herzenberg, Meth. Enzymol. (1984) 108: 197). Du lazerius prietaisas leidžia registruoti keturis fluorescencinius parametrus ir du šviesos sklaidos parametrus kiekvienoje analizuojamoje ląstelėje. Likę eritrocitai, negyvos ląstelės ir nuosėdos buvo pašalinti iš analizės, dažant PI (propidžio jodidas). Ląstelių populiaciją prieš FACS izoliuojama, mėginys praskiedžiamas santykiu 1: 1 HBSS, 10 minučių centrifuguojamas esant 200 RCF ir vėl suspenduojamas 50 arba 100 µl HBSS Hemocitometrui skaičiuoti. Paimamas reikiamas ląstelių kiekis, jos žymimos aprašytais antikūnais ir atliekama analizė. Kultūros tyrimai buvo atlikti taip: buvo naudojamos įvairios pelių stromos ląstelių linijos, iš kurių trys aprašytos Whitlock ir kt., Cell (1987) 48: 1009-1021. Stromos ląstelių sluoksniai buvo palaikomi

iki 3-4 savaičių, keičiant auginimo terpę kas 5–7 dienas. Stromos ląstelių sluoksniai buvo tris kartus plaunami terpe, kurioje nėra serumo, tada užpilami 2,5 ml (T-25 flakone) 0,5 mg/ml kolagenazės dispazės. Kultūros inkubuojamos 15-30 minučių 37° C temperatūroje; tada ląstelės buvo surenkamos ir resuspenduojamos RPMI-1640 terpėje su serumu. Stromos ląstelės buvo suspenduotos „Pasteur“ pipete, po to kultivuojamos tiesiogiai nuo 1–5 iki 1–50 pradinės ląstelių koncentracijos. Žmogaus stromos ląstelių linijos buvo auginamos panašiai. Žmogaus vaisiaus kaulų čiulpų ląstelių suspensijos buvo gautos iš ilgų vaisiaus kaulų 10–18 neštumo savaitę. Kaulai perpjaujami išilgai, o vidinė ertmė subraižoma skalpelio ašmenimis. Kaulai dedami į 1 mg/ml kolagenazės/dispazės tirpalą RPMI-1640 ir inkubuojami 30 minučių 37° C temperatūroje. Po to vidinė ertmė praplaunama terpėmis (RPMI-1640 su Pen/Strep, 2-ME ir 5% FCS), kad būtų pašalintos hematopoetinės ląstelės. Suaugusiųjų kaulų čiulpai gaunami iš čiulpų aspiratų, iš kurių prieš naudojimą pašalinami raudonieji kraujo kūneliai. Vaisiaus kaulų čiulpų FACS identifikavimas buvo atliktas dalijant frakcijas į CD34⁺, CD10⁺, CD19⁺ ir CD34⁺ CD10⁻, CD19⁻. Tada frakcijos aštuonias savaites nuolat auginamos, nesant hidrokortizono, ir tikrinamos, ar nėra mieloidinių ląstelių ir B ląstelių. Išrūšiuotos ląstelių populiacijos ir nerūšiuotos ląstelės buvo analizuojamos atskyrimo metu (t=0), taip pat dvidešimt pirmą parą (t=21). FACS dažymo profilio analizė, kai t=0, rodo, kad mieloidinės ir B ląstelės buvo veiksmingai pašalintos iš CD34⁺ CD10⁻CD33⁻ ląstelių. Priešingai, 21 parą apie 50% CD34⁺ CD10⁻ CD33⁻ ląstelių buvo B ląstelės. Per 21 parą B ląstelių skaičius padidėjo 100 kartų. Palyginimui, CD34⁺ CD10⁺ CD33⁺ ląstelės rodo dramatišką B ląstelių ir bendro ląstelių skaičiaus sumažėjimą per 21 parą. Nustatyta, kad CD34⁺ CD10⁺ CD33⁻ ląstelės gali būti pirmtakės B-ląstelėms, mieloidinėms ląstelėms ir eritroidinėms ląstelėms. Panašūs rezultatai gaunami, kai ląstelės yra atskirtos remiantis CD34, CD10, CD19, CD33 arba CD34, CD3, CD7, CD8, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33.

Žmogaus kaulo fragmentai gali būti persodinami įvairiose vietose į švitintas (200-300 rad.) arba nešvitintas CB17 SCID/SCID peles. Kaulų fragmentai auga mažiausiai 9 mėnesius, nuolat gamindami žmogaus B, mieloidines ir eritroidines ląsteles. Kaulų fragmentai yra palaikomoji mikroaplinka žmogaus alogeninių pirmtakų populiacijoms. Alogeninius kaulų čiulpų pirmtakus (neatitikimas HLA I klasei) galima įšvirškinti į kaulo fragmentą prieš arba po transplantacijos pelėje-gavėjoje. Jei prieš transplantaciją reikia įšvirškinti pirmtakes ląsteles, išrūšiuotos ląstelės įleidžiamos į kaulą mikroinjekcijomis, po to injekuoti kaulai inkubuojami kambario temperatūroje prieš transplantaciją į CB17 SCID/SCID peles. Jei įšvirškinti ląsteles reikia po transplantacijos po 6 savaičių kaulų transplantatas gali būti švitinamas (200–1000 rad.), po to suleidžiamos ląstelės. Kaip alternatyva, ląstelės gali būti švirškščiamos į nešvitintus kaulų fragmentus. Kaulų čiulpų tyrimo rezultatai rodo, kad CD34⁺ ląstelės turi praktiškai visus kaulų

čiulpų regeneravimo gebėjimus. CD34 populiacijos subfrakcija parodė, kad CD34 Thy⁺ ląstelės (5% CD34 ląstelių) turi praktiškai visą B ląstelių, mieloidinių ląstelių ir eritroidinių pirmtakų aktyvumą. Tyrimą galima sėkmingai atlikti su 10–10 000 ląstelių. Žmogaus kamieninių ląstelių atsinaujinimo ir ilgaamžiškumo įvertinimui gali būti naudojamas antrinis perdavimo tyrimas. Donoro ląstelės švirkščiamos į neatitinkančius HLA kaulų fragmentus. Po 2 - 3 mėnesių gautos donoro ląstelės, kurios pasidaugino, gali būti panaudotos kamieninių ląstelių fenotipui nustatyti (CD34⁺, Thy⁺, Lin⁻). Tada šios ląstelės pakartotinai įšvirkščiamos į antrą neatitinkantį HLA donorą. Po 1–3 mėnesių kaulas įvertinamas pagal įvairias pirmtakų populiacijas, taip pat kamienines ląsteles. Tokiu būdu galima įvertinti ilgalaikį kamieninių ląstelių potencialą, kad būtų sukurtos įvairios kilmės hematopoetinės ląstelės, taip pat įvertinti kamieninių ląstelių skaičių.

Šis išradimas apibūdina ląsteles, kurios yra iš esmės homogeniškos ir pasižymi žmogaus hematopoetinių kamieninių ląstelių savybėmis. Taigi, tinkamai parinkus veiksnius ir parengus biologinius tyrimus, leidžiančius savarankiškai atstatyti kamienines ląsteles ir atrenkant kamienines ląsteles pagal jų paviršiaus žymenis, iš esmės homogeniška gyvybinga žmogaus hematopoetinių kamieninių ląstelių kultūra gali būti gaminama įvairiais tikslais. Kamieninės ląstelės gali būti naudojamos transplantuojant kaulų čiulpus, kai ląstelės gali būti atskirtos nuo neoplastinių arba kitų patogeninių ląstelių, pvz. ŽIV infekuotų ląstelių. Be to, naudojant grynas kamienines ląsteles bus išvengta transplantato-šeimininko ligos. Ląstelės gali būti modifikuotos tiek homologine, tiek nehomologine rekombinacija siekiant ištaisyti genetinius defektus arba suteikti genetines galimybes, kurių natūraliai trūksta kamieninėms ląstelėms. Kadangi aprašytame metode iš esmės nėra kitų ląstelių, kamieninių ląstelių kultūra gali būti naudojama izoliuoti ir apibrėžti veiksnius, susijusius su regeneracija ir diferenciacija [21].

Hematopoetinės kamieninės ląstelės, paveiktos in vitro fukosiliniu, ir jų naudojimo metodai (angl. Hematopoietic stem cells treated by in vitro fucosylation and methods of use US7332334B2.)

Šis išradimas aprašo virkštelės hematopoetinių kamieninių ląstelių kultivavimo metodus, siekiant pagerinti jų terapinį naudingumą. Uždegimo metu P-selektinas ir E-selektinas kartu daro įtaką leukocitų judėjimui ir adhezijai ant kraujagyslių paviršiaus. Kaulų čiulpų transplantacijos metu P-selektinas ir E-selektinas taip pat tarpininkauja į veną suleistų hematopoetinių kamieninių ląstelių grįžimui į kaulų čiulpus. Daugelyje audinių P-selektinas ir E-selektinas ekspresuojami endotelio ląstelėse selektyviai, tačiau jie nuolat ekspresuojami ant kaulų čiulpų endotelio ląstelių. Selektinai kaip ligandai naudoja α 2,3-sialilintus ir α 1,3-fukosilintus glikanus, tokius kaip sialyl Lewisx (sLex) ant glikoproteinų, arba glikolipidus kaip ligandus. Įrodyta, kad

hematopoetinės kamieninės ląstelės pasižyminčios CD44 raiška jungiasi su E-selektinu *in vitro*. Manoma, kad glikoproteinų ligandai turi sLex struktūras.

Iš vieno asmens surinktos hematopoetinės kamieninės ląstelės gali būti persodintos į kito asmens kaulų čiulpus po intraveninės infuzijos. Šis metodas buvo plačiai naudojamas gydant įvairius hematologinius sutrikimus, tokius kaip leukemija. Klinikiniam taikymui žmogaus hematopoetinės kamieninės ląstelės yra gaunamos iš trijų skirtingų šaltinių: kaulų čiulpų, suaugusiųjų periferinio kraujo ir virkštelės kraujo. Nors visame pasaulyje yra užregistruota daugiau nei 5 milijonai negiminingų kaulų čiulpų savanorių donorų, dėl HLA polimorfizmo daugeliui pacientų vis dar kyla problemų surasti donorus su vienodais žmogaus leukocitų antigenais (HLA). Lyginant su kaulų čiulpais ir suaugusiųjų periferiniu krauju, virkštelės kraujas turi keletą galimų pranašumų. Transplantacija greičiau įvykdoma dėl plataus ir greito ląstelių prieinamumo ir mažiau griežtų reikalavimų dėl donoro ir recipiento HLA tapatumo, nes mažesnė ūminio ir lėtinio transplantato-šeimininko ligos rizika. Galimi transplantacijos, naudojant virkštelės kraujo hematopoetines kamienines ląsteles, o ne hematopoetines kamienines ląsteles iš kaulų čiulpų ar suaugusiųjų periferinio kraujo, pranašumai yra šie: 1) didelis potencialių donorų fondas; 2) greitas prieinamumas, nes virkštelės kraujas buvo iš anksto patikrintas; 3) audinių bankuose galima pasiekti didesnę rasinę įvairovę, sutelkiant rinkimą į ligonines, kuriose gimsta vaikai, turintys nepilnai atstovaujama etninę kilmę; 4) mažesnė rizika ir diskomfortas donorui; 5) retas užteršimas virusais ir 6) mažesnė transplantato-šeimininko ligos rizika, net tiems pacientams, kurių audinių sutapimas yra ne tobulas. Taigi iš virkštelės kraujo išgaunamos hematopoetinės kamieninės ląstelės pastaraisiais metais buvo vis dažniau naudojamos transplantacijai.

Transplantacijos metu į veną sušvirkštos hematopoetinės kamieninės ląstelės specifiskai įsitvirtina kaulų čiulpuose, kad galėtų daugintis - procesas, kuris apibūdinamas kaip hematopoetinės kamieninės ląstelės homingas. Homingas buvo plačiai ištirtas tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. Manoma, kad homingas priklauso nuo adhezijos molekulių sąveikos tarp hematopoetinių kamieninių ląstelių ir kaulų čiulpų endotelio. Tyrimai su pelėmis, kurioms trūko PSGL-1, parodė, kad PSGL-1 tarpininkauja leukocitų pririšimui prie P-selektino ir palaiko pririšimą prie sraute esančio E-selektino. PSGL-1 taip pat jungiasi su L-selektinu, kuris sustiprina leukocitų judėjimą ant endotelio ląstelių paviršių. Žmogaus PSGL-1 P-selektino ir L-selekto jungimosi vieta apima peptidų seką, kurioje yra trys tirozino sulfato liekanos šalia treonino, prie kurio yra prijungtas specifinis išsišakojęs, fukosilinto branduolio-2O-glikanas. Fukozės dalis yra būtina jungiantis prie P-selektino. Fukozilimą katalizuoja α 1,3-fukosiltransferazių šeima. Tarp jų α 1,3-fukozililtransferazė IV (FT-IV) ir α 1,3-fukosiltransferazė VII (FT-VII) ekspresuojama žmogaus leukocituose. Hematopoetinės kamieninės ląstelės gali diferencijuoti į skirtingas kraujodaros

ląstelių linijas, tokias kaip raudonieji kraujo kūneliai, mieloidinės ląstelės, limfocitai ir trombocitai. Žmogaus hematopoetinės kamieninės ląstelės ekspresuoja paviršiaus glikoproteiną CD34, kuris įprastai naudojamas hematopoetinių kamieninių ląstelių identifikavimui ir atskyrimui. Tokios žmogaus CD34⁺ ląstelės atspindi nevienalytę palikuonių populiaciją, turinčią skirtingą kraujodaros subrendimo laipsnį. Kito paviršiaus baltymo CD38 nebuvimas („-“) arba sumažintos („žemos“) ekspresijos lygis žmogaus CD34⁺ ląstelėse yra laikomas CD34⁺ ląstelių primityvios subpopuliacijos žymeniu. Taigi, CD34⁺ CD38^{low/-} pogrupio ląstelės, sudarančios maždaug 10-20% visų CD34⁺ ląstelių iš kaulų čiulpų ar suaugusiųjų periferinio kraujo, pasižymi stipriu kamieninių ląstelių aktyvumu. Pažymėtina, kad maždaug 30% virkštelės kraujo hematopoetinių kamieninių ląstelių yra CD34⁺ CD38^{low/-}. Tačiau, skirtingai nei CD34⁺ CD38^{low/-} suaugusiųjų periferinio kraujo kamieninių ląstelių, žinoma, kad virkštelės kraujo CD34⁺ CD38^{low/-} hematopoetinių kamieninių ląstelių homingas į kaulų čiulpus yra sumažėjęs, o tai pirmiausia priklauso nuo žmogaus hematopoetinių kamieninių ląstelių sąveikos su P-selektinu mikrokraujagyslių endotelyje. Tėkmės citometrijos analizė rodo, kad šis defektas atsiranda dėl nefunkcinio PSGL-1, išreikšto šiose CD34⁺ CD38^{low/-} iš virkštelės kraujo gautose hematopoetinėse kamieninėse ląstelėse. Taigi susilpnėjęs CD34⁺ CD38^{low/-} hematopoetinių kamieninių ląstelių sugebėjimas prisijungti prie P-selektino bent iš dalies paaiškina uždelstą trombocitų ir mieloidų įsodinimą, susijusį su virkštelės kraujo HSC transplantacija [22].

Virkštelės kraujo panaudojimas gydyti sergantiems ir turintiems sutrikimų žmonėms (angl. Use of umbilical cord blood to treat individuals having a disease, disorder or condition US20040219136A1.)

Šis patentas aprašo virkštelės kraujo ir iš virkštelės kraujo gautų kamieninių ląstelių naudojimo didelėmis dozėmis būdus įvairioms būklėms, ligoms ir sutrikimams gydyti. Iš virkštelės kraujo gautos kamieninės ląstelės yra naudojamos didelėmis dozėmis, pvz., mažiausiai 3 milijardai branduolių turinčių ląstelių kiekvienam gydymui, kai gydymas gali apimti vieną ar kelias infuzijas. Išradimas taip pat numato virkštelės kraujo ar iš virkštelės kraujo gautų kamieninių ląstelių, gautų iš kelių donorų, naudojimą be HLA tipo nustatymo. Šis išradimas iš dalies pagrįstas atradimu, kad virkštelės kraujas asmenims gali būti skiriamas didelėmis dozėmis ir nereikia nustatyti HLA. Tai stebina, nes paprastai audinių transplantacija apima kruopštų donoro ir recipiento audinių tipų suderinamumo nustatymą, kad būtų galima sėkmingai ir ilgam persodinti alogenines ląsteles recipiente ir sumažinti transplantato-šeimininko ligos riziką. Tai labai palengvina virkštelės kraujo surinkimą iš kelių donorų, kad būtų galima ląsteles skirti vienam asmeniui. Vartojant didelėmis dozėmis, galima gauti pakankamai virkštelės kraujo kamieninių ląstelių, kad būtų užtikrinta ilgalaikė suvirkštų ląstelių transplantacija. Šiame

išradime taip pat pateikiami virkštelės kraujo paveikimo augimo faktoriumi, pvz., Citokinu ir (arba) interleukinu, metodai, siekiant paskatinti ląstelių diferenciaciją. Virkštelės kraujas arba iš jo gautos kamieninės ląstelės gali būti laikomos surinktos iš pavienio asmens (t. y. kaip vienas vienetas) arba gali būti sujungtos su kitais. Iš virkštelės kraujo gautos kamieninės ląstelės, gautos pagal šio išradimo metodus, gali apimti pluripotentes ląsteles, t.y. ląsteles, turinčias visišką diferenciacijos universalumą, kurios atsinaujina ir gali likti „miego“ būsenoje ar ramiai tūnoti audinyje. Virkštelės kraujyje daugiausia aptinkamos CD34⁺ ir CD38⁺ hematopoetinės pirmtakinės ląstelės, taip pat mažesnės nediferencijuotų ar primityvių kamieninių ląstelių populiacijos. Iš virkštelės kraujo gautos kamieninės ląstelės gali būti auginamos po surinkimo, naudojant gerai žinomus metodus, pavyzdžiui, naudojant maitinančio sluoksnio ląsteles, tokias kaip apšvitinti fibroblastai, arba kondicionuotose terpėse, kad būtų gautos ilgalaikės kultūros. Kamieninės ląstelės taip pat gali būti padaugintos prieš surinkimą arba *in vitro* po surinkimo. Tam tikruose aprašytuose metoduose kamieninės ląstelės, kurios turi būti padaugintos, veikiamos agentu, kuris slopina ląstelių diferenciaciją, arba kultivuojamos esant jam. Tokie agentai yra gerai žinomi šioje srityje ir apima, bet neapsiriboja, žmogaus Delta-1 ir žmogaus Serrate-1 polipeptidais, leukemijos slopinimo faktoriumi (LIF) ir kamieninių ląstelių faktoriumi. Virkštelės kraujo gautų kamieninių ląstelių gyvybingumas, proliferacijos potencialas ir ilgaamžiškumas gali būti įvertintas naudojant žinomus standartinius metodus, tokius kaip tripano mėlynojo testas, fluoresceino diacetato įsisavinimo tyrimas, propidžio jodido įsisavinimo tyrimas (gyvybingumui įvertinti); ir timidino įsisavinimo tyrimas, MTT ląstelių proliferacijos tyrimas (proliferacijos įvertinimui). Ilgaamžiškumas gali būti nustatomas gerai žinomais metodais, tokiais kaip maksimalus populiacijos dvigubėjimas kultūroje.

Agentai, galintys sukelti kamieninių ar progenitorinių ląstelių diferenciaciją, yra gerai žinomi šioje srityje ir apima, bet tuo neapsiriboja: Ca²⁺, EGF, α -FGF, β -FGF, PDGF, keratinocitų augimo faktorių (KGF), TGF- β , citokinus (pvz., IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TNF), retinoinė rūgštis, transferinas, hormonai (pvz., androgenai, estrogenai, insulinas, prolaktinas, trijodtironinas, hidrokortizonas, deksametazonas), natrio butiratas, TPA, DMSO, NMF, DMF, matricos elementų (pvz., Kolageno, laminino, heparano sulfato, Matrigel™) arba jų derinius. Kai iš virkštelės kraujo gautos kamieninės ląstelės yra skatinamos diferencijuotis į tam tikrą ląstelių tipą, jos veikiamos augimo faktoriais, pagal gerai žinomus metodus. Augimo veiksniai gali būti: GM-CSF, IL-4, Flt3L, CD40L, IFN-alfa, TNF-alfa, IFN-gama, IL-2, IL-6, retinoinė rūgštis, bazinis fibroblastų augimo faktorius, TGF-beta-1, TGF-beta-3, hepatocitų augimo faktorius, epidermio augimo faktorius, kardiotropinas-1, angiotenzinogenas, angiotenzinas I (AI), angiotenzinas II (visi), visi AT2 tipo receptorių agonistai arba jų analogai ar fragmentai. Agentai, slopinantys ląstelių diferenciaciją, taip pat yra gerai žinomi šioje srityje ir apima, bet

neapsiriboja: žmogaus Delta-1 ir žmogaus Serrate-1 polipeptidai, leukemijos slopinimo faktorius (LIF) ir kamieninių ląstelių faktorius. Kamieninių ląstelių diferenciacija į tam tikrą ląstelių tipą gali būti nustatyta žinomu metodu, pvz., matuojant morfologijos ir ląstelių paviršiaus žymenų pokyčius, naudojant tokius metodus kaip tekės citometrija ar imunocitochemija, tiriant ląstelių morfologiją, naudojant šviesinę ar konfokalinę mikroskopiją, arba išmatuojant genų raiškos pokyčius, naudojant gerai žinomus metodus, tokius kaip PGR ir genų raiškos profiliavimas.

Norint atlikti kaulų čiulpų transplantaciją, reikia sušvirkšti maždaug $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ kaulų čiulpų vienbranduolių ląstelių vienam paciento kilogramui (t.y. 70 kg donorui maždaug 70 ml kaulų čiulpų). Norint gauti 70 ml kaulų čiulpų, reikia intensyvaus donorystės proceso ir stebimas reikšmingas kraujo praradimas. Ląstelės, gautos iš nedidelio kaulų čiulpų kiekio (pvz., 7–10 ml), galėtų būti padaugintos bioreaktoriuje prieš infuziją į recipientą. Kraujo ląstelės atsinaujina tarp chemoterapinių procedūrų, tačiau vėžys turi laiko augti ir dėl natūralios atrankos gali būti atsparesnis chemoterapijos vaistams. Todėl kuo ilgesnė chemoterapija ir kuo trumpesnė gydymo trukmė, tuo didesnė tikimybė sėkmingai nužudyti vėžį. Norint sutrumpinti laiką tarp chemoterapijos seansų, į pacientą galima suleisti virkštelės kraujo ar virkštelės kraujo kamieninių ląstelių. Toks gydymas sutrumpintų laiką, per kurį pacientui būtų nustatytas mažas kraujo ląstelių skaičius, ir todėl būtų galima anksčiau tęsti chemoterapinį gydymą.

Pagal šį išradimą agentai, sukeliantys ląstelių diferenciaciją, gali būti naudojami virkštelės kraujui ar iš virkštelės kraujo gautoms kamieninėms ląstelėms kultivuoti. Agentas, sukeliantis diferenciaciją, gali būti pridedamas prie ląstelių populiacijos terpėje įskaitant, bet neapsiribojant: Ca^{2+} , EGF, α -FGF, β -FGF, PDGF, keratinocitų augimo faktoriumi (KGF), TGF- β , citokiniais (pvz., IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TFN), retinoine rūgštimi, transferinu, hormonais (pvz., Androgenai, estrogenai, insulinas, prolaktinas, trijodtironinas, hidrokortizonas, deksametazonas), natrio butiratu, TPA, DMSO, NMF, DMF, matricos elementais (pvz., Kolagenas, lamininas, heparano sulfatas, Matrigel™) arba jų deriniais [23].

Virkštelės kamieninių ląstelių iš suderintų audinių perdavimo transplantacijai sistema ir metodas (angl. System and method for delivering umbilical cord-derived tissue-matched stem cells for transplantation US20020132343A1.)

Šis išradimas susijęs su sistemomis ir metodais kamieninių ląstelių gamybai, reguliavimo patvirtinimui ir pristatymui. Struktūrizuotą virkštelės kraujo panaudojimo sistemą sudaro virkštelės kraujo kamieninių ląstelių rinkimas, gamyba, licencijavimas ir pristatymas. Šio išradimo aprašyta virkštelės kraujo sistema (angl. SCBS) iš vieno donoro virkštelės kraujo šaltinio gali pagaminti pakankamą kiekį virkštelės kraujo kamieninių ląstelių transplantacijai suaugusiesiems. SCBS turi galimybę gaminti pakankamą kiekį iš virkštelės kraujo gautų

pirmtakinių ląstelių, kad būtų galima pakartotinai transplantantus naudoti kliniškai. SCBS produktai gali būti skiriami žmonėms siekiant užkirsti kelią ligoms ar sužalojimams, juos gydyti, diagnozuoti. Ląstelių produktai, kuriuos turi generuoti SCBS, yra naudojami gydyti ligas, reaguojančias į kamieninių ląstelių ir pirmtakų ląstelių įvedimą, taip pat diferencijuotas ląsteles specifiniams audinių tipams. Todėl SCBS gali būti naudojamas tokioms ligoms kaip vėžys gydyti, prieš pradėdant arba netaikant chemoterapijos. SCBS taip pat gali būti naudojamas genetinėms ligoms ištaisyti, kai žmogaus audiniai, pvz., Pjautuvinės anemijos, nesugeba sukurti funkcionalių ląstelių. Į SCBS gamybos metodus įtraukti virkštelės CD34⁺ hematopoetinių kamieninių ląstelių dauginimo procesai iš vieno virkštelės šaltinio, serumo neturintioje terpėje, pavyzdžiui, QBSF-60. Viename šio išradimo įgyvendinimo variante CD34⁺ ląstelės yra padaugintos daugiau nei 200 kartų. Šio išradimo SCBS apima CD34⁺ kamieninių ląstelių padauginimo iš vieno virkštelės šaltinio procesą. SCBS metodu CD34⁺ ląstelės yra padaugintos maždaug 200 kartų ir (arba) pagamina apie 100 milijonų CD34⁺ kamieninių ląstelių [24].

7. Virkštelės audinio kamieninių ląstelių dauginimas ir terapinės galimybės

Virkštelės kamieninės ląstelės gali būti išgaunamos iš kelių audinių: mezenchiminės kamieninės ląstelės iš amniotinės membranos, virkštelės dangalo (*angl. cord lining*), drebutinio audinio ir perivaskulinio regiono, o hematopoetinės kamieninės ląstelės iš virkštelės kraujo [25]. Šios ląstelės, kaip ir kamieninės ląstelės iš kitų šaltinių, gali būti panaudojamos terapiniais tikslais, įvairioms ligoms gydyti, taip pat kaip ląstelių šaltinis transplantacijoms. Kadangi jos charakterizuotos vėliau nei kitos kamieninės ląstelės (pvz., kaulų čiulpų kamieninės ląstelės), virkštelės kraujo kamieninių ląstelių terapinis potencialas vis dar tiriamas.

Ankstesniuose skyriuose minėti virkštelės kraujo bankai kai kuriuose šalyse (pvz., Lenkijoje PBKM/FamiCord group audinių banke, JAV, taip pat Taivane) saugo ne tik virkštelės kraujo ląsteles, bet ir užšaldytas virkštelės mezenchimines kamienines ląsteles, išskirtas iš drebutinio audinio. Ateityje būtų idealu užšaldyti visą virkštelę, taip nebūtų prarandamos ląstelės. Šiuo metu naudojamos naujos technologijos vientiso virkštelės audinio užšaldymui, su galimybe atšildžius gauti jį pradinės būsenos. Naudojant šios dienos metodus užšaldžius visą virkštelę vis dar neįmanoma gauti pakankamai gyvybingų kamieninių ląstelių. Dėl šios priežasties mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms išgauti naudojami švieži virkštelės audinio fragmentai. Daugelyje Europos audinių bankų yra galimybė saugoti susmulkintą virkštelės audinį. Norint naudoti virkštelės kraujo ląsteles pacientams, turi būti laikomasi geros gamybos praktikos taisyklių, atliekamas 14 dienų standartinis ląstelių kultūros sterilumo patikrinimas, kad

būtų nustatyta ar yra bakterinė infekcija (Gram dažymas), tikrinama dėl mikoplazmų bei tiriami ląstelių paviršiaus žymenys ir diferenciacijos potencialas, endotoksinų lygis ir gyvybingumas po atšildymo.

Pagal Ding ir kt. (2015) įvairių virkštelės audinių kamieninės ląstelės gali būti panaudojamos kaip:

- **Maitinantis sluoksnis embrioninėms kamieninėms ląstelėms.** Žmogaus virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti maitinantis sluoksnis, turintis netumorogeninį (*angl. nontumorigenic*) poveikį dėl sumažėjusio c-myc signalinio kelio aktyvumo.
- **Priešvėžinės terapijos agentas.** Dauguma solidinių vėžio (*angl. solid cancers*) terapijos tyrimų naudojant virkštelės mezenchimines kamienines ląsteles. Žmogaus krūties vėžio ląstelių linija MDA MB-231 yra labiausiai tiriama ląstelių linija. *In vivo* tyrimas atskleidė, kad tris savaites injekuojant virkštelės audinio mezenchimines kamienines ląsteles į veną galima susilpninti krūties naviko augimą. Kitame tyrime buvo naudojama žiurkių krūties vėžio ląstelių linija, siekiant ištirti priešvėžinį žiurkių virkštelės kamieninių ląstelių (rUSC) poveikį. Nustatyta, kad rUSC injekcija į veną gali susilpninti naviko augimą. Be to, visiškai naviko regresiją galima pasiekti po 1 mėnesio injekcijų, o efektas išlieka ilgiau nei 3 mėnesius. Virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių sukeliamas naviko slopinimo poveikis priklauso nuo kontakto su ląstelėmis ir internalizacijos, tai gali būti stebima *in vitro* ir *in vivo*. *In vitro* nustatyta, kad DKK1, kurį išskiria virkštelės kraujo mezenchiminės kamieninės ląstelės, gali slopinti naviko augimą fosfatazės ir tenzino homologo (PTEN) keliu. Taip pat nustatyta, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės auginamos kartu su vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis sukelia jų apoptozę. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės taip pat mažina ksenografinio naviko dydį per fosfoinositido-3-kinazės (PI3K) ir Akt signalinius kelius. Tiriant endometrinės karcinomos TOV-112D ląsteles, naudojant kondicionuotą terpę ir virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių lizatus nustatyta, kad kondicionuota terpė ir ląstelių lizatai gali slopinti naviko ląstelių dauginimąsi ir priversti jas likti sub-G1, einančioje į apoptozės stadiją. Buvo stebimas BAX, BCL2, autofagijos ir išgyvenamumo genų pakitęs reguliavimas. Daroma išvada, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės išskiria molekules, slopinančias naviką. Be krūties vėžio, tyrimai atlikti su plaučių vėžiu ir gauti panašūs rezultatai. Maurya ir kt. publikavo straipsnį apie rUSC naudojimą pelių plaučių adenokarcinomai slopinti, nustatyta, kad rUSC gali susilpninti vėžio plitimą ir kolonijų susidarymą. Dauguma vėžio ląstelių lieka G0/G1 fazėje, pastebimas pakitęs ciklino A ir nuo ciklino priklausomos kinazės 2 (CDK2) reguliavimas. Gydydamas naudojant rUSC gali sumažinti naviko dydį ir svorį. Preliminarūs kito tyrimo rezultatai atskleidžia, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės veikia

SKOV3 ląsteles (kiaušidžių vėžio ląstelių linija), slopinamos P21/Rb signalinį kelią. Neseniai virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo pradėtos tirti Burkitto limfomos gydymui. Ląstelių proliferacija, gyvybingumas ir limfomos ląstelių žūtis buvo stipriai slopinamos po 48 valandų poveikio virkštelės mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis ar jų ekstraktais, o tai rodo, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės išskiria molekules, kurios oksidacinio streso keliais slopina limfomos ląstelių augimą.

- **Saugios ląstelės, ląstelėmis paremta terapija.** Ankstyvųjų ikiklinikinių ir klinikinių mezenchiminių kamieninių ląstelių tyrimų stadijų metu persodintų virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių saugumas yra gerai aprašytas gyvūnų modeliuose ir bandymuose su žmonėmis. Tačiau veiksmingumas žmonėms *in vivo* yra prieštaringas. Siekiant patikrinti saugumą, virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo švirkščiamos į veną nežmoginiams primatams. Ląstelės buvo švirkščiamos kartą per 2 savaites, 6 savaites *cynomolgus* beždžionėms. Nebuvo pranešta apie su kamieninių ląstelių transplantacija susijusį toksiškumą, o visos tirtos injekcijos vietos ir organai buvo normalūs, navikų susidarymo nestebėta. Tolesni ilgalaikiai *in vivo* tyrimai turi būti atlikti siekiant užtikrinti mezenchiminių kamieninių ląstelių saugumą ir gali padidinti persodintų mezenchiminių kamieninių ląstelių, gautų iš suaugusiųjų žmonių audinių terapinį efektyvumą. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti naudojamos specifinei ląstelių terapijai. Atliekami sėkminga vaikų hematologinių susirgimų, cerebrinio paralyžiaus ir kt. atvejų terapija Duike universitete, JAV. Liublino medicinos universiteto (Lenkija) neurologai siekia gydyti smegenų traumų turinčius vaikus, naudodami virkštelės kraujo kamienines ląsteles. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti diferencijuojamos ir naudojamos *in vivo*, gydant galvos smegenų išemiją, Parkinsono ligą, Alzheimerio ligą, išsėtinę sklerozę, cerebrinis paralyžius, autizmas, tinklainės ligas, 1 ir 2 tipo cukrinį diabetą, miogeninius susirgimus ir kt.[25].

8. Iš virkštelės kraujo ir audinio išgautų ląstelių panaudojimas ir terapinės galimybės

Virkštelės kraujas gali būti naudojamas atliekant kraujodaros ląstelių transplantaciją. Broxmeyer ir kt. pirmieji aiškiai įrodė, kad virkštelės kraujas yra gausus persodinamų kraujodaros pirmtakinių ląstelių šaltinis. Tais pačiais metais Gluckman ir kt. dokumentais patvirtinta pirmoji kraujodaros ląstelių transplantacija, kurioje hematopoezės ląstelių pirmtakių šaltiniu buvo naudojamas virkštelės kraujas, o ne kaulų čiulpai. Pažymėtina, kad autoriai sugebėjo atkurti Fanconi anemija sergančio vaiko hematopoetinę sistemą, naudodamiesi virkštelės krauju iš HLA tapataus broliuko. Kraujodaros ląstelių transplantacijos sėkmė priklauso

nuo to, ar yra tinkamas donoras. Geriausias donoras yra visas HLA atitinkantis giminaitis ar nesusijęs donoras. Deja, remiantis vidutiniu šeimos dydžiu, mažiau nei 30 % pacientų turės suderintą gimininę donorą. Taigi, transplantacijos sėkmės procentą iš dalies riboja imunologinės komplikacijos, tokios kaip transplantato prieš šeimininką liga (GVHD), transplantato atmetimas ir uždelstas imuninės sistemos atstatymas. Žinoma, imunologinės komplikacijos neturėtų būti veiksnys atliekant autologinę transplantaciją. Ūminė GVHD yra viena pagrindinių sergamumo ir mirštamumo priežasčių po alogeninių ląstelių transplantacijos. Ūminio GVHD vystymosi rizikos veiksniai yra recipiento amžius, donoro ląstelių šaltinis ir HLA skirtumai. Atsižvelgiant į tai, nors ribotas hematopoezės pirmtakių ląstelių skaičius viename virkštelės kraujo vienete neleidžia jo vartoti pacientams, kurių kūno masė didesnė ir sukelia uždelstą kraujodaros atsivimą ir didesnį mirtingumą, vis dažniau pasirenkami du iš dalies HLA suderinti vienetai. Nepaisant vieno ar dviejų antigenų skirtumų tarp donoro ir šeimininko, po virkštelės kraujo transplantacijos GVHD atsiranda rečiau, palyginti su po HLA suderintų kaulų čiulpų ar mobilizuoto periferinio kraujo iš nesusijusių donorų transplantacijų.

Nors virkštelės kraujas daugiausia naudojamas transplantacijai kraujo sutrikimams gydyti, ligų, kurioms jis veiksmingas, spektras buvo išplėstas. Virkštelės kraujas taip pat naudojamas kaip regeneracinės ląstelių terapijos ar imuninės moduliacijos forma. Pavyzdžiui, neseniai buvo pranešta apie galimybę surinkti, paruošti ir panaudoti šviežias autologines virkštelės kraujo ląsteles kūdikiams, sergantiems hipoksine-išemine encefalopatija. Alogeninė UCB terapija kartu su rekombinantiniu žmogaus eritropoetinu parodė galimą terapinį efektyvumą vaikams, sergantiems cerebriniu paralyžiumi. Taip pat, dėl virkštelės kraujo praturtinimo kraujagyslių formavimo pirmtakais, angiogenezė buvo sukelta 27 metų moteriai, sergančiai Behçet multisistemine liga. Kitais tyrimais nustatyta, kad autologinė virkštelės kraujo infuzija vaikams, sergantiems 1 tipo cukriniu diabetu, buvo saugi ir sukėlė T-ląstelių dažnio pokyčius, tačiau neišsaugojo C-peptido. Intratracheralinis alogeninių virkštelės kraujo vienetų persodinimas kūdikiams, kuriems nustatoma bronchų ir plaučių displazija, pasirodė esąs saugus ir įmanomas, tačiau tai reikalauja didesnio, kontroliuojamo II fazės tyrimo, kaip pranešė Chang ir kt. Įdomu tai, kad de Lima ir kt. ištyrė ląstelių įsisavinimą suaugusiems pacientams, sergantiems piktybine hematologine liga, kuriems buvo persodinti du virkštelės kraujo vienetai, iš kurių vienas turėjo virkštelės kraujo ląsteles, kurios *ex vivo* buvo padaugintos naudojant alogenines mezenchimines kamienines ląsteles. Autoriai padarė išvadą, kad iš virkštelės kraujo gautų, laboratorijoje padaugintų ląstelių transplantacija atrodo saugi ir efektyvi bei žymiai pagerina ląstelių įsisavinimą [26].

Taigi, virkštelės audinių taikymo sritys šiuo metu iš esmės apima neurologinio deficito, kepenų ligų, imuninės sistemos ligų, diabeto, plaučių pažeidimo, inkstų pažeidimo, ūminės

leukemijos ir kt. ligų gydymą. Didžioji dalis baigtų tyrimų buvo I arba II fazėse, kai buvo gydoma >100 pacientų.

- **Stebimas augantis klinikinis žmogaus virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymas vėžiui gydyti**, nepaisant nuolatinių abejonių dėl mezenchiminių kamieninių ląstelių vaidmens kovojant su naviku. Kai kurie tyrimai parodė, kad po mezenchiminių kamieninių ląstelių injekcijų, pastebėtas spartesnis naviko ląstelių augimas, lyginant su kontrolinėmis grupėmis. Mezenchiminės kamieninės ląstelės gali diferencijuoti į su karcinoma susijusius fibroblastus, sustiprinti naviko augimą ir invaziją, skatinti vėžio ląstelių dauginimąsi ir migraciją, palaikyti angiogenezės formavimąsi ir netgi sukelti antiapoptinį poveikį bei atsparumą vaistams. Nepaisant to, kai kurie tyrėjai teigia, kad piktybinė transformacija yra tik teorinė rizika ir kad navikų susidarymo tikimybė, persodinus mezenchiminės kamieninės ląstelės, yra maža. Lala ir kt. atliktoje sisteminėje apžvalgoje buvo padaryta išvada, kad tumorigeninis poveikis gali atsirasti tik tiems pacientams, kurie kenčia nuo nuolatinio ar buvusio piktybinio proceso. Be to, buvo nustatyta, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės slopina navikinių ląstelių dauginimąsi. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali sekti mikroskopinius navikus ir patologinius pažeidimus, nerizikuodamos padėti plisti naviko ląstelėmis, todėl galėtų būti naudojamos kaip kelių priešvėžinių agentų nešiotojai. Kai atsiranda atsparumas vaistams arba sisteminis gydymas nepavyksta, ląstelės gali būti naudojamos kaip potenciali dirbtinė nešiklio sistema priešvėžiniams vaistams ar naviką slopinantiems genams transportuoti. Nors ginčai egzistuoja, vėžio terapija, pagrįsta virkštelės mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, turi daug žadančių ateitį.
- **Insultas.** Išeminis insultas yra viena iš trijų pagrindinių sergamumo ir mirštamumo priežasčių, nepaisant pastarojo meto pažangos farmakologiniame ligos valdyme ir šiuolaikinių intervencijos metodų. Metinis sergamumas siekia 250–400 iš 100 000 gyventojų visame pasaulyje, daugelis insultą patyrusių pacientų išgyvena nuolatinę neurologinę negalią. Paprastai manoma, kad neuronai turi ribotą regeneraciją. Po sužalojimo nervinio audinio atstatymas atliekamas formuojant rando audinius, o tai sukelia neigiamą remodeliavimąsi ir smegenų disfunkciją. Keletas tyrimų atskleidė, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali įgyti neuronų ir glijos ląstelių morfologines ir biochemines savybes, kai veikiamos tinkamomis diferenciacijos terpėmis *in vitro*, tuo tarpu *in vivo* tik kelios iš prigijusių virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės reiškė neuronų fenotipą. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali generuoti bioaktyvius veiksnius, tokius kaip smegenų neurotrofininis faktorius, į insuliną panašus augimo faktorius 1 ir neurotrofinas 3, skatindamos būdingų ląstelių dauginimąsi, sumažindamos pažeistų

ląstelių apoptozę, taip pat skatindamos angiogenezę, aksonų regeneraciją ir sinaptogenezę bei daugybę kitų kompensacinių reakcijų tiek ūminio, tiek lėtinio pažeidimo metu. Iki šiol tik keliuose klinikiniuose tyrimuose buvo patikrintas virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių terapijos poveikis insultui. Pirmasis klinikinis tyrimas, apibūdinantis virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių naudojimą, buvo paskelbtas 2011 m. Pritaikius virkštelės mezenchimines kamienines ląsteles 4 insultą patyrusiems pacientams, dviem išeminio insulto pacientams iš keturių buvo stebima padidėjusi raumenų jėga, bet 6 mėnesių stebėjimas neleido padaryti objektyvių išvadų. Panašius rezultatus aprašė kitame klinikiame tyrime, kurį atliko Chen ir kt. 2013 m. tirta 10 pacientų patyrusių lėtinį insultą. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės, kurių dozė buvo $1,0-2,3 \cdot 10^7$, buvo suleistos į veną. Ilgalaikio stebėjimo metu nebuvo galima pastebėti jokių klinikinių ar laboratorinių šalutinių poveikių, o daugumai pacientų klinikinė neurologinė funkcija pagerėjo.

- **Nugaros smegenų pažeidimai.** Nugaros smegenų pažeidimai yra vienas neurologinių sutrikimų, galinčių sukelti sensorinius ir motorinius trūkumus. Šiuo metu vienintelė standartinė nugaros smegenų pažeidimų terapija yra chirurgija, didelės metilprednizolono dozės ir simptominis gydymas. Naujasis regeneracinis gydymas suteikia perspektyvų požiūrį į nugaros smegenų pažeidimų gydymą, tarp jų daug žada virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės. Ikiklinikinių eksperimentų metu dažniausiai naudojami gyvūnų modeliai yra žiurkės ir šunys. Pateiktos ląstelių dozės svyruoja nuo $1 \cdot 10^5$ iki $2 \cdot 10^6$. Ūminė ir poūmė sužalojimo fazės buvo pagrindinis transplantacijos laikas, tačiau keletas tyrimų taip pat persodino virkštelės mezenchimines kamienines ląsteles lėtinėje stadijoje po nugaros smegenų pažeidimų, kai randas jau buvo suformuotas, stebėtas reikšmingas klinikinis pagerėjimas. Pagrindinis ištirtas virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių naudojimo būdas yra infuzija pažeidimo vietoje. Nepaisant skirtingų gyvūnų modelių, laiko, dozės, virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių perdavimo būdo, panašūs teigiami rezultatai stebėti visuose tyrimuose. Po transplantacijos virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės migravo į traumos vietą ir išgyveno, skatindamos funkcinį atsigavimą. Glaudžiai susiję mechanizmai yra parakrininis poveikis ir imunomoduliuojantis poveikis, kuris vėliau gali modifikuoti glijos ląstelių aktyvumą, sumažinti fibrozę, padidinti aksonų išsaugojimą, paskatinti endogeninių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją bei padidinti išgyvenančių ląstelių-šeimininkų skaičių.
- **Neurodegeneracinės ligos.** Dėl priešūždegiminių ir regeneracinių savybių virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės tampa labai naudinga priemone būsimiems neurodegeneracinių sutrikimų gydymo būdams. Atvirame tyrime, kuriame dalyvavo penki optinį neuromielitą turintys pacientai, visi simptomai, klinikinės laboratorijos rezultatai ir

magnetinio rezonanso tomografijos rodikliai buvo žymiai pagerėję po keturių iš eilės virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių injekcijų į veną. Klinikiniai tyrimai taip pat buvo atlikti pacientams, sergantiems išsėtine skleroze (MS). Po virkštelės kraujo injekcijų klinikiniai simptomai buvo sušvelninti, o vėlesnis vertinimas naudojant išplėstinę negalios būsenos skalę ir magnetinio rezonanso tomografija buvo žymiai pagerintas. Neseniai atliktas platesnio masto klinikinis tyrimas papildomai įrodė virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių saugumą ir veiksmingumą sergantiesiems išsėtine skleroze.

- **Transplantato - šeimininko liga.** GVHD yra su transplantacija susijusi komplikacija, kurią sukelia donoro aktyvios T ląstelės. Pagal atsiradimo laiką prieš arba po 100 dienų po transplantacijos, tai gali būti apibrėžta kaip ūminė ar lėtinė GVHD. Pirmos eilės GVHD terapija yra kortikosteroidų terapija, o antros eilės gydymas pacientams, kurie yra atsparūs steroidų terapijai, nėra aiškiai nustatytas dėl išgyvenamumo lygio mažiau nei 10 proc. per 5 metus. Pastaraisiais dešimtmečiais gausūs *in vitro*, *in vivo* ir ikiklinikinių eksperimentų duomenys, teikiantys vilčių, leido manyti, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės gali ne tik sukelti minimalų imuninį reaktyvumą, bet ir turėti imunomoduliacinį bei priešuždegiminį poveikį. Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės išreiškia mažesnę MHC II klasės antigenų kiekį ir santykinai mažiau MHC I klasės antigenų nei kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės. Dėl visų šių puikių savybių virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės yra idealus kandidatas gydyti GVHD.
- **Kepenų ligos.** Nors 2006 m. buvo pranešta apie pirmąjį intraveninių kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių transplantacijos tyrimą kepenų cirozei gydyti, neseniai atliktas *in vitro* tyrimas pranešė, kad pacientams, sergantiems lėtiniu hepatitu B ar kepenų ciroze, autologiniai kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių transplantatai gali būti netinkami. Randomizuotas placebo kontroliuojamas kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių transplantacijos tyrimas cirozės atveju net padarė išvadą, kad cirozę patyrusiems pacientams, kuriems kaulų čiulpų mezenchiminės kamieninės ląstelės yra infuzuojamos į periferinę veną, nėra teigiamo poveikio. Šiuo atžvilgiu virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti geresnis pasirinkimas šiems pacientams. Po infuzijos kamieninės ląstelės gali įsiterpti pažeistose kepenyse, diferencijuotis į albuminus gaminančius hepatocitus, sumažinti kepenų fibrozę, pakelti albumino kiekį serume ir pagerinti endogeninių ląstelių išgyvenamumą. Vienas iš pirmųjų klinikinių virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių taikymo kepenų fibrozei gydyti tyrimas buvo atliktas 2011 m. I fazės klinikiniam tyrimo Zhang ir kt. 30 pacientų, sergančių dekompenсуota kepenų ciroze, skyrė $0,5 \cdot 10^6$ /kg kūno svorio virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių dozes. Ląstelės buvo infuzuojamos į veną tris kartus, kas 4 savaites. Po 40 savaičių

stebėjimo žymiai sumažėjo ascito kiekis ir pagerėjo kepenų funkcija visiems virkštelės mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis gydomiems pacientams. Stebėjimo metu nė vienam pacientui nepageidaujamo poveikio nepastebėta. Gavusi vilčių teikiančius rezultatus, ta pati komanda vėliau bandė įvertinti virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių transplantacijos pacientams, sergantiems ūminiu ir lėtiniu kepenų nepakankamumu, saugumą ir pagrįstumą. Iš viso buvo įtraukti 43 pacientai, sergantys ūminiu ir lėtiniu kepenų nepakankamumu, ir visi iš 24 pacientų, gydytų virkštelės mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, pasiekė geresnį terapinį poveikį nei kontrolinė grupė. Norint patvirtinti standartinio virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių vartojimo normą, reikalingas tolesnis kelių centrų, didesnio masto, atsitiktinių imčių, dvigubai aklas, placebo kontroliuojamas klinikinis tyrimas.

Virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių terapiniai mechanizmai. Dabar yra kelios populiarios teorijos apie virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių terapinį mechanizmą. Pirma, virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali pakeisti pažeistas ląsteles, dėl savo galimybių atsinaujinti ir diferencijuotis. Antra, parakrininiai veiksniai gali slopinti užprogramuotą ląstelių-šeimininkų mirtį, modifikuoti imunologines funkcijas ir skatinti endogeninių kamieninių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, kuri dabar yra pripažinta kaip pagrindinis mechanizmas. Be to, įrodyta, kad abipusė virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių ir ląstelių-šeimininkų sąveika vaidina lemiamą vaidmenį.

- **Šeimininko ląstelės pakeitimas.** Yra du paaiškinimai, kaip pakeisti ląsteles: transdiferencijacija ir ląstelių suliejimas. Transdiferencijacija reiškia mezenchiminių kamieninių ląstelių sugebėjimą diferencijuoti į įvairius ląstelių tipus. Ląstelių susiliejęs reiškia susiliejęmą tarp MSC ir ląstelių-šeimininkų, dėl kurio gali būti perprogramuojamas branduolys, kad būtų ekspresuojami mezenchiminių kamieninių ląstelių specifiniai genai ir nuo apoptozės apsaugotos ląstelės-šeimininkės. Iki šiol ląstelių susiliejęs galima stebėti Purkinje ląstelėse, miokardo ir kepenų ląstelėse. Iš pradžių manyta, kad ląstelių pakeitimas yra pagrindinis veiksmingas virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių mechanizmas. Tačiau daugybei tyrėjų tai sukėlė abejonių. Nustatyta, kad po transplantacijos didelė virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių dalis gali būti stebima kepenų, blužnies, plaučių ir kitų nenukreiptų audinių kapiliaruose. Ląstelių, patenkančių į pažeistą vietą, nėra pakankamai, kad būtų galima atnaujinti audinius. Todėl mažai tikėtina, kad pakeitimas yra pagrindinis būdas, kuriuo virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės daro apsauginį poveikį.

- **Parakrininiai veiksniai.** Mokslininkai kreipė daugiau dėmesio į virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių parakrininius veiksnius. Jie parodė, kad virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės gali išskirti daugybę įvairių augimo faktorių, citokinų ir chemokinų (įskaitant hepatocitų augimo faktorių, iš stromos gauto 1 faktorių ir monocitų chemotaktinio baltymą 1, kraujagyslių endotelio augimo faktorių, insulino tipo augimo faktorių 1, interleukiną-8, smegenų neurotrofinis faktorių ir iš glijos ląstelių išvestą neurotrofinis faktorių (GDNF) ir kt.). Šie veiksniai gali padėti išvengti gretimų ląstelių apoptozės, skatinti angiogenezę, moduluoti uždegimą ir suaktyvinti vidines kamienines ląsteles, kurios padeda sukurti palankią aplinką vidiniams atstatomiesiems procesams. Parakrininis virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikis patvirtintas tiek *in vitro*, tiek *in vivo* tyrimais. Pavyzdžiui, iš virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių gauta kondicionuota terpė sugebėjo sustiprinti angiogenezę *in vitro*, o kondicionuojamos terpės injekcija į gyvūnų modelius galėjo paskatinti persodintų ląstelių migraciją.
- **Ląstelių-ląstelių kontaktai.** Virkštelės mezenchiminės kamieninės ląstelės yra specialioje mikroaplinkoje, kurioje jos gali sąveikauti su ląstelėmis šeimininkėmis per standžią jungtį, tarpų jungtį ir desmosomą, kad paveiktų ląstelių-šeimininkų dauginimąsi, migraciją ir diferenciaciją. Nepaisant to, žinių apie galimą virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių ir jų kaimyninių ląstelių sąveiką yra gana mažai. Reikia išsamesnio supratimo apie galimą abipusę virkštelės mezenchiminių kamieninių ląstelių ir ląstelių-šeimininkų sąveiką. Tai gali suteikti mums alternatyvią koncepciją, norint nuspręsti transplantuotų ląstelių likimą, ir padėti mums išsiaiškinti ląstelinės terapijos strategijas [27].

9. Apibendrinimas

Virkštelės kraujo kamieninės ląstelės – didžiausias potencialius naujas kamieninių ląstelių šaltinis pasaulyje ir tampa vis patrauklesniu transplantacijos tyrimų objektu, nes nesukelia etinių problemų, yra sukauptas didelis potencialių donorų fondas, galimas greitas transplanto prieinamumas, mažesnė rizika ir diskomfortas donorui, retas transplanto užteršimas virusais ir mažesnė transplantato-šeimininko ligos rizika, net tiems pacientams, kurių audinių suderinamumas yra ne tobulas. Taip pat yra sukurti standartizuoti virkštelės kraujo surinkimo ir ilgalaikio saugojimo metodai. Tačiau virkštelės kraujas kol kas nėra dažnai transplantuojamas, dėl vis dar keliamų iššūkių: persodinus imuninės sistemos atstatymas vėluoja, todėl padidėja infekcijos rizika; pirminės ligos atkrytis išlieka pagrindine pacientų mirties priežastimi po transplantacijos; minimali ląstelių dozė laikoma vienu virkštelės kraujo vienetu yra 125×10^7 arba

150×10^7 branduolį turinčių ląstelių, kai vienai transplantacijai reikia sušvirkšti maždaug 1×10^8 – 2×10^8 vienbranduolių ląstelių vienam paciento kilogramui. Taigi, kyla poreikis tiksles virkštelės kraujo ląsteles padauginti *in vitro*. Virkštelės kraujo hematopoetinės kamieninės ląstelės tiriamos daugelio mokslinių grupių ir yra nustatyti joms būdingi paviršiaus žymenys ($CD34^+CD38^-CD45RA^{low}CD71^{low}Thy-1^+c-kit^{low}Rh^{low}$). Yra kuriami ir patentuojami *ex vivo* ir *in vitro* ląstelių padauginimo metodai (kokultūros, kondicionuotos terpės, bioreaktoriai), išaiškinti šių ląstelių kamieniškumą, diferenciaciją ir ekspansiją skatinantys veiksniai.

Virkštelės audinio kamieninės ląstelės taip pat galėtų būti perspektyvios įvairių ligų gydymui. Yra dedamos pastangos, jog galima būtų užšaldyti ir ilgą laiką saugoti visą virkštelę išsaugant visas pirmines jos savybes. Šiam tikslui naudojami skirtingi metodai, vis dėlto kuriamos ir naujos, tam skirtos technologijos.

Taigi, esami metodai nėra pilnai tinkami virkštelės kraujo/audinio iš vieno donoro kamieninių ląstelių parengimui vieno suaugusio paciento transplantacijai, tad dažniau yra transplantuojamas vaikams. Todėl yra būtina tobulinti metodus šiam tikslui, maksimaliai išplėsti panaudojimo galimybes ir išnaudoti terapinį prenatalinių ląstelių potencialą.

Apibendrinant, galima manyti, kad artimoje ateityje virkštelės kraujas ir audinys, kaip etiškas ir dauguma aspektų pranašesnis už kitus kamieninių ląstelių šaltinis, bus plačiai naudojamas įvairių kritinių ligų prevencijai ir gydymui.

Literatūros sąrašas

1. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology*. 2015 May 1;67(3):387–96.
2. Umbilical cord | embryology [Internet]. *Encyclopedia Britannica*. [cited 2020 Feb 12]. Available from: <https://www.britannica.com/science/umbilical-cord>
3. Arno A, Smith AH, Blit PH, Shehab MA, Gauglitz GG, Jeschke MG. Stem Cell Therapy: A New Treatment for Burns? *Pharmaceuticals*. 2011 Oct 21;4(10):1355–80.
4. He X, Gonzalez V, Tsang A, Thompson J, Tsang TC, Harris DT. Differential Gene Expression Profiling of CD34+ CD133+ Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*. 2005 Apr 1;14(2):188–98.
5. Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, Rizzoli V. Umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. *Haematologica*. 1995 Jan 1;80(5):473–9.
6. Chou S, Chu P, Hwang W, Lodish H. Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):427–8.
7. Molecule boosts numbers of stem cells in umbilical cord blood [Internet]. *Science News*. 2014 [cited 2020 Mar 27]. Available from: <https://www.sciencenews.org/article/molecule-boosts-numbers-stem-cells-umbilical-cord-blood>
8. Cohen S, Roy J, Lachance S, Delisle J-S, Marinier A, Busque L, et al. Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1–2 safety and feasibility study. *Lancet Haematol*. 2020 Feb 1;7(2):e134–45.
9. Chagraoui J, Lehnertz B, Girard S, Spinella JF, Fares I, Tomellini E, et al. UM171 induces a homeostatic inflammatory-detoxification response supporting human HSC self-renewal. *PLOS ONE*. 2019 Nov 8;14(11):e0224900.
10. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *STEM CELLS*. 2009;16(3):153–65.
11. Bari S, Seah KKH, Poon Z, Cheung AMS, Fan X, Ong S-Y, et al. Expansion and Homing of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Clinical Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun 1;21(6):1008–19.
12. Wagner JE, Broxmeyer HE, Cooper S. Umbilical Cord and Placental Blood Hematopoietic Stem Cells: Collection, Cryopreservation, and Storage. *J Hematother*. 1992 Jan 1;1(2):167–73.
13. Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med*. 2004;8(2):223–31.
14. Chivu M, Diaconu CC, Brasoveanu L, Alexiu I, Bleotu C, Banceanu G, et al. Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. *J Cell Mol Med*. 2002;6(4):609–20.

15. Yao C-L, Chu I-M, Hsieh T-B, Hwang S-M. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol*. 2004 Aug 1;32(8):720–7.
16. Ballen K. Umbilical Cord Blood Transplantation: Challenges and Future Directions. *Stem Cells Transl Med*. 2017 May;6(5):1312–5.
17. Wagner JE, Brunstein CG, Boitano AE, DeFor TE, McKenna D, Sumstad D, et al. Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell*. 2016 Jan 7;18(1):144–55.
18. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):62–70.
19. Rocha V, Gluckman E. Clinical Use of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan 1;12(1, Supplement 1):34–41.
20. Pineault N, Abu-Khader A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol*. 2015 Jul 1;43(7):498–513.
21. <https://patents.google.com/patent/US5643741A/en>
22. <https://patents.google.com/patent/US7332334B2/en>
23. <https://patents.google.com/patent/US20040219136A1/en>
24. <https://patents.google.com/patent/US20020132343A1/en>
25. Ding D-C, Chang Y-H, Shyu W-C, Lin S-Z. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339-347.
26. Roura S, Pujal J-M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):123.
27. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(9):1293-1306.