

MARIA ALEKSANDRA KRÓL, ELŻBIETA URBANOWSKA, MAGDALENA ELŻBIETA FELIKSBROT,  
BEATA BLAJER, ELŻBIETA GRACZYK-POL, JADWIGA DWILEWICZ-TROJACZEK

## Fenotypowa charakterystyka komórek CD34<sup>+</sup> uzyskiwanych z krwi pępowinowej i z produktu leukaferazy od zdrowych dawców po mobilizacji czynnikiem wzrostu

### Comparison of Antigen Expression on the Haematopoietic Stem Cells Derived from Cord Blood and Product of Leukapheresis from Healthy Donors Mobilized by G-CSF

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Krew obwodowa osób dorosłych oraz krew pępowinowa różnią się pod względem liczby komórek macierzystych i prekursorowych. Krew obwodowa, szczególnie po mobilizacji, jest bogatym źródłem komórek prekursorowych, co wpływa korzystnie na wczesny efekt przeszczepienia. Krew pępowinowa natomiast zawiera ograniczoną liczbę komórek prekursorowych oraz stosunkowo dużo komórek macierzystych.

**Cel pracy.** Zbadanie charakterystyki antygenowej komórek CD34<sup>+</sup> uzyskiwanych z krwi pępowinowej (KP) oraz produktu leukaferazy (PL) osób zdrowych mobilizowanych G-CSF w celu przeszczepienia allogenicznego komórek krwiotwórczych i porównanie ekspresji antygenów powierzchniowych w badanych grupach.

**Materiał i metody.** Analizie cytometrycznej poddano 21 jednostek krwi pępowinowej (KP) i 22 produkty leukaferazy (PL) od zdrowych dawców, którym uprzednio podawano podskórnie G-CSF w dawce 10 µg/kg m.c./dobę. Preparat komórkowy uzyskiwano z użyciem separatora komórkowego COBE Spectra. Na komórkach CD34<sup>+</sup> badano ekspresję antygenów CD90, CD117, CD123, CD133, CD135, CD19, CD10, CD2, CD33, CD71, CD38.

**Wyniki.** W obydwu grupach stwierdzono podobne odsetki komórek CD34<sup>+</sup> z koekspresją antygenów CD133, CD117, CD123, CD135, CD33, CD19, CD2. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice w przypadku antygenów CD38 (KP: 84,4 ± 4,9%; PL: 90,3 ± 5,4%), CD10 (KP: 30,2 ± 8,1%; PL: 15,1 ± 7,9%), CD90 (KP: 27,3 ± 13,8%; PL: 52,0 ± 17,0%), CD71 (KP: 83,3 ± 11,3%; PL: 95,6 ± 4,2%). Wśród komórek CD34<sup>+</sup> pochodzących z krwi pępowinowej ponadto stwierdzono wyższy odsetek komórek o fenotypie CD38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (KP: 14,5 ± 4,2%; PL: 8,8 ± 5,2%), co może wyjaśniać dużą użyteczność krwi pępowinowej jako źródła komórek krwiotwórczych, mimo ich niewielkiej liczby w pojedynczej jednostce KP.

**Wnioski.** Stwierdzenie wyższego odsetka komórek CD38<sup>+</sup> oraz CD38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> we krwi pępowinowej może tłumaczyć dużą przydatność kliniczną tego materiału, mimo uzyskiwania małej liczby krwinek białych i komórek CD34<sup>+</sup> (Adv Clin Med Exp 2005, 14, 5, 883–890).

**Słowa kluczowe:** komórki CD34<sup>+</sup>, krew pępowinowa, produkt leukaferazy, cytometria przepływowa.

#### Abstract

**Background.** Peripheral blood of adults and cord blood differ in their content of progenitor and stem cells. Adult peripheral blood particularly after mobilization procedure contains a large number of progenitor cells which allow early engraftment. Cord blood has low number of progenitor cells but it has quite high content of stem cells.

**Objectives.** The present study was undertaken to compare phenotype of CD34<sup>+</sup> cells from two sources of allografts: cord blood and product of leukapheresis from healthy donors.

**Material and Methods.** Twenty-one samples of cord blood (CB) and twenty-two products of leukapheresis (PL) were analysed by flow cytometry. The healthy donors were treated with G-CSF (10 µg/kg/day) until the day of leukapheresis with the help of COBE Spectra cell sorter. The immunophenotype of cell suspension was detected using

panel of FITC and PE conjugated MoAbs reactive with antigens including: CD90, CD117, CD123, CD133, CD135, CD19, CD10, CD2, CD33, CD71, CD38.

**Results.** The phenotype analysis of CD34 cells derived from CB and PL showed similar in the both groups percentage of these cells with antigens coexpression as follows: CD133, CD117, CD123, CD135, CD33, CD19, CD2. However, it has been significance difference between examined groups in expression of antigens on the CD34 cells: CD38 (CB:  $84.4\% \pm 4.9\%$ ; PL:  $90.3 \pm 5.4\%$ ), CD10 (CB:  $30.2 \pm 8.1\%$ ; PL:  $15.1 \pm 7.9\%$ ), CD90 (CB:  $27.3 \pm 13.8\%$ ; PL:  $52.0 \pm 17.0\%$ ), CD71 (CB:  $83.3 \pm 11.3\%$ ; PL:  $95.6 \pm 4.2\%$ ). Besides its cord blood included characteristic CD34<sup>+</sup> subpopulation with phenotype CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>, which have been observed in higher percentage in CB unit than PL (CB:  $14.5 \pm 4.2\%$ ; PL:  $8.8 \pm 5.2\%$ ).

**Conclusion.** CD34<sup>+</sup> subpopulation with phenotype CD38<sup>-</sup> and CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>, which have been observed in higher percentage in CB, could explain helpfulness of cord blood for transplantation although one unit CB may have non-sufficient number of stem cells for adult engraftment (*Adv Clin Med Exp* 2005, 14, 5, 883–890).

**Key words:** CD34<sup>+</sup> cells, cord blood, product of leukapheresis, flow cytometry.

Przeszczepianie krwiotwórczych komórek macierzystych jest obecnie szeroko stosowaną metodą w leczeniu nowotworów zarówno chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, jak i guzów litych. Metoda jest również stosowana we wrodzonych chorobach genetycznych oraz nienowotworowych chorobach układu krwiotwórczego, takich jak aplazja szpiku lub dysfunkcja układu odpornościowego.

Spośród chorych zakwalifikowanych do megachemioterapii wspomaganej przeszczepieniem allogenicznym komórek macierzystych tylko 25–30% posiada zgodnego genotypowo dawcę rodzinnego. Dla pozostałych chorych, którzy spełniają kryteria do przeszczepienia komórek szpiku od dawcy niespokrewnionego i odpowiadają limitom wiekowym dla tej procedury poszukuje się stosownego dawcy w bankach dawców. Według opracowań amerykańskich, taki przeszczep otrzymuje mniej niż 40% zakwalifikowanych chorych, co uzasadnia poszukiwania i badania alternatywnych do szpiku źródeł komórek macierzystych, zdolnych do odbudowy układu krwiotwórczego po megachemioterapii.

Przez wiele lat jedynym źródłem komórek wykorzystywanych do przeszczepienia był szpik kostny. Obecnie jest już ustalona wartość komórek krwiotwórczych uzyskiwanych z krwi obwodowej, które mogą być mobilizowane ze szpiku z użyciem czynników wzrostu, chemioterapii lub kombinacji obydwu tych sposobów. Powody, dla których przeszczepianie obwodowych komórek krwiotwórczych może być korzystniejsze od przeszczepiania szpiku są następujące: 1) przyspieszenie odnowy krwiotworzenia i rekonstrukcji układu odpornościowego; 2) uzyskiwanie komórek macierzystych odbywa się na drodze aferezy niewymagającej znieczulenia ogólnego; 3) w przypadku przeszczepień autologicznych u chorych z pierwotnym lub wtórnym zajęciem szpiku kostnego przez komórki nowotworowe uzyskuje się zmniejszenie liczby tych komórek w produkcie aferezy. Kolejnym źródłem komórek krwiotwórczych jest krew pępowinowa. Jest to ta część krwi obwodo-

wej noworodka, która pozostaje w naczyniach łożyska i sznura pępowinowego po odpięciu. Od pierwszych, zakończonych sukcesem przeszczepień komórek krwiotwórczych, pochodzących z krwi pępowinowej, dokonanych w latach 80. XX wieku wykonano już setki podobnych zabiegów, szczególnie u dzieci. Przy przeszczepieniu krwi pępowinowej nie jest wymagana całkowita zgodność w układzie HLA dawcy i biorcy, ponadto rzadziej niż po przeszczepieniu szpiku obserwuje się chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD), co może być wynikiem niedojrzałości limfocytów dawcy. Ograniczenia w stosowaniu krwi pępowinowej u dorosłych wynikają ze stosunkowo małej jej objętości i, co za tym idzie, małej liczby komórek macierzystych. Obecnie prowadzi się prace nad zastosowaniem preparatów składających się z kilku jednostek krwi pępowinowej od różnych dawców w celu bezpiecznego ich wykorzystania u osób dorosłych [1].

Przełomem w badaniach nad komórką macierzystą krwiotworzenia było wykrycie na jej powierzchni glikoproteiny błonowej – antygenu CD34. Rola tej cząsteczki nie jest do końca wyjaśniona, uważa się, że uczestniczy w regulacji przylegania komórek krwiotworzenia do komórek podścieliska szpiku. Ekspresja antygenu CD34<sup>+</sup> zmniejsza się wraz z dojrzewaniem komórek, w związku z czym za najmłodsze, najwartościowsze uważa się komórki CD34<sup>+</sup> wykazujące najsilniejszą ekspresję tego antygenu (CD34<sup>+</sup> bright).

Odsetek komórek CD34<sup>+</sup> oznaczanych we frakcji komórek jednojądrowych w zależności od materiału, w jakim są oznaczane waha się od około 1,5% w szpiku kostnym, około 0,6% we krwi pępowinowej do 0,06% we krwi obwodowej [2–5]. W celu zwiększenia liczby komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej stosuje się czynniki wzrostu (G-CSF, GM-CSF) i/lub chemioterapię, uzyskując nawet kilkunastokrotny wzrost liczby tych komórek we krwi obwodowej [4].

Populacja komórek CD34<sup>+</sup> zarówno we krwi obwodowej, jak i pępowinowej jest populacją heterogenną złożoną z komórek macierzystych – naj-

mniej zróżnicowanych, jak i komórek ukierunkowanych, nabywających markery różnicowania się do określonych linii komórkowych. Wykrycie obecności lub braku ekspresji poszczególnych antygenów może służyć określeniu heterogenności badanych populacji komórek CD34<sup>+</sup>. Badania prowadzone w ciągu ostatnich kilku lat dowodzą, że o powodzeniu procedury przeszczepienia komórek krwiotwórczych decyduje nie tylko ich liczba, ale i jakość [6, 7].

Subpopulacje progenitorowych komórek CD34<sup>+</sup> mogą być definiowane przez wykrycie tzw. markerów liniowo swoistych i/lub przez wykrycie ekspresji antygeny CD38. Wśród komórek CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> są wykrywane komórki CD33<sup>+</sup> (progenitory mieloidalne), CD10<sup>+</sup> (progenitory limfoidalne), CD19<sup>+</sup> (progenitory limfoidalne linii B), CD2<sup>+</sup> (progenitory limfoidalne linii T), CD71<sup>+</sup> (progenitory erytroidalne).

Brak ekspresji antygeny CD38 jest charakterystyczny dla wielopotencjalnych, nie zróżnicowanych komórek krwiotworzenia.

Oprócz markerów liniowo swoistych do oceny populacji komórek CD34<sup>+</sup> mogą być wykorzystywane antygeny związane z najwcześniejszymi, tzw. macierzystymi komórkami krwiotwórczymi, które są punktem wyjścia dla wszystkich linii krwiotwórczych. Do markerów tych należą: receptory dla kluczowych w hematopoezie cytokin: CD117 – receptor dla czynnika steel, CD123 – podjednostka  $\alpha$  receptora dla IL-3, CD135 (FLT3) receptor dla FLT3-L oraz CD90 (Thy-1) – antygen uczestniczący w interakcjach międzykomórkowych i CD133 (wcześniej AC133) – stosunkowo niedawno poznana glikoproteina o nieznanej funkcji [8–10], charakteryzująca się unikatową budową białka o 5 domenach, co według niektórych autorów może mieć znaczenie w interakcjach międzybiałkowych z elementami podścieliska szpiku [9].

## Materiał i metody

Zbadano świeże próbki krwi pępowinowej ( $n = 21$ ) oraz pojedynczego (pierwszego lub drugiego) produktu leukaferazy ( $n = 22$ ) od osób zdrowych, u których w celu uzyskania komórek CD34<sup>+</sup> przeprowadzono procedurę mobilizacji z zastosowaniem czynnika wzrostu G-CSF (Neupogen lub Granocyte) podawanego podskórnie w dawce 10  $\mu\text{g/kg}$  m.c./dobę. Aferezę z użyciem seraratora komórkowego COBE Spectra rozpoczynano po stwierdzeniu co najmniej 10 komórek CD34<sup>+</sup> w mikrolitrze krwi obwodowej.

Wieloparametrowej analizy komórek macierzystych (wykazujących ekspresję antygeny CD34)

dokonano metodą cytometrii przepływowej z użyciem aparatu FACS Calibur (BDIS), metodą dwu- lub trójkolorową w układzie CD34/SSC z użyciem przeciwciała CD34 PerCP (klon 8G12). W teście zostały użyte następujące przeciwciała monoklonalne: CD33 PE (klon P67.6) dla komórek linii mieloidalnej, CD10 RPE (klon SS2/36), CD19 RPE (klon HD37) i CD2 FITC (klon MT910) dla linii limfoidalnej, CD71FITC (klon Ber-T9) dla linii erytroidalnej, CD 38 FITC (klon HB7) do określenia stopnia różnicowania się komórek CD34<sup>+</sup> w kierunku poszczególnych linii komórkowych oraz przeciwciała reagujące z antygenami charakterystycznymi dla wczesnych komórek krwiotwórczych: CD133 PE (klon AC133/1), CD117 RPE (klon 104D2), CD90 PE (klon 5E10), CD123 PE (klon 9F5) oraz CD135 PE (klon SF1.340). Analizowano co najmniej 500 komórek CD34<sup>+</sup>. Wynik podano w postaci odsetka komórek CD34<sup>+</sup> wykazujących ekspresję badanych antygenów wobec kontroli izotypowej.

Do analizy statystycznej użyto testu *t*-Studenta dla grup niezależnych oraz testu korelacji Pearsona, przyjmując poziom istotności  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Zgodnie z oczekiwaniami jednostki krwi pępowinowej i produkty leukaferazy znacząco różniły się pod względem całkowitej liczby krwinek białych (ang. WBC): (PL:  $22,38 \pm 6,93 \times 10^9$ ; KP:  $1,11 \pm 0,47 \times 10^9$ ) i komórek CD34<sup>+</sup> (PL:  $87,28 \pm 64,16 \times 10^6$ ; KP:  $4,37 \pm 3,58 \times 10^6$ ), odsetek komórek CD34<sup>+</sup> natomiast w obydwu preparatach był podobny (PL:  $0,39 \pm 0,22\%$ ; KP:  $0,38 \pm 0,25\%$ ). Wyniki badań ilościowych przedstawia tabela 1.

Analiza fenotypowa komórek CD34<sup>+</sup> pochodzących z krwi pępowinowej (KP) i produktu leukaferazy (PL) wykazała podobny w obu grupach odsetek komórek z koekspresją antygenów: CD133 (KP:  $88,0 \pm 7,1\%$ ; PL:  $87,7 \pm 5,0\%$ ), CD117 (KP:  $90,5 \pm 9,1\%$ ; PL:  $94,0 \pm 3,2\%$ ), CD123 (KP:  $78,6 \pm 7,7\%$ ; PL:  $71,7 \pm 15,1\%$ ), CD135 (KP:  $73,3 \pm 16,2\%$ ; PL:  $74,7 \pm 20,8\%$ ), CD33 (KP:  $85,2 \pm 12,0\%$ ; PL:  $81,5 \pm 16,0\%$ ), CD19 (KP:  $5,3 \pm 3,2\%$ ; PL:  $5,1 \pm 2,9\%$ ), CD2 (KP:  $11,6 \pm 7,5\%$ ; PL:  $8,4 \pm 7,3\%$ ).

Stwierdzono istotne statystycznie różnice występujące między badanymi grupami w przypadku antygenów: CD38, CD90, CD10 i CD71. W przypadku antygeny CD10 wyższy odsetek komórek CD34<sup>+</sup> posiadających ten marker stwierdzono w grupie próbek krwi pępowinowej (KP:  $30,2 \pm 8,1\%$ ; PL:  $15,1 \pm 7,9\%$ ), a odsetek komórek CD34<sup>+</sup> z koekspresją antygenów CD90, CD38 i CD71 był wyższy w grupie próbek z produktem

**Tabela 1.** Wartości bezwzględne leukocytów (WBC) i komórek CD34<sup>+</sup> oraz odsetek komórek CD34<sup>+</sup> uzyskany w preparacie krwi pępowinowej i w produkcie leukaferazy

**Table 1.** The absolute number of leukocytes (WBC), CD34<sup>+</sup> cells and percentage of CD34<sup>+</sup> cells in cord blood and product of leukapheresis

Źródło komórek (Source of cells)	WBC $\times 10^9$ w preparacie średnia $\pm$ SD (mean $\pm$ SD)	CD34 <sup>+</sup> $\times 10^6$ w preparacie średnia $\pm$ SD (mean $\pm$ SD)	%CD34 <sup>+</sup> /WBC średnia $\pm$ SD (mean $\pm$ SD)
Krew pępowinowa (Cord blood)	1,11 $\pm$ 0,47	4,37 $\pm$ 3,58	0,38 $\pm$ 0,25
Produkt leukaferazy (Product of leukapheresis)	22,38 $\pm$ 6,93	87,28 $\pm$ 64,16	0,39 $\pm$ 0,22

leukaferazy: (CD90: PL: 52,0  $\pm$  17,0%, KP: 27,3  $\pm$  13,8%; CD38: PL: 90,3  $\pm$  5,4%, KP: 84,4  $\pm$  4,9%; CD71: PL: 95,6  $\pm$  4,2%, KP: 83,3  $\pm$  11,3%).

W obydwu badanych grupach została wyodrębniona subpopulacja komórek CD34<sup>+</sup> o szczególnie silnej ekspresji antygenu CD71 (CD71<sup>high</sup>), która występowała w znacząco wyższym odsetku w grupie próbek z produktem leukaferazy (PL: 19,2  $\pm$  3,0%; KP: 16,1  $\pm$  3,5%;  $p = 0,003478$ ). Większość komórek CD71<sup>+</sup> wykazywała koekspresję antygenu CD33.

Porównywano również subpopulację komórek CD34<sup>+</sup> o fenotypie CD38<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>. Odsetek tych komórek był znacząco wyższy we krwi pępowinowej: KP: 14,5  $\pm$  4,2%, PL: 8,8  $\pm$  5,2%;  $p = 0,000316$ . Szczegółowe dane dotyczące odsetka komórek CD34<sup>+</sup> z ekspresją badanych antygenów przedstawiono w tabeli 2.

Ponadto badanie korelacji między poszczególnymi antygenami (w grupach) ujawniło wiele zależności. W grupie PL najwyższą korelację dodatnią wykryto między odsetkiem komórek CD34<sup>+</sup> z koekspresją antygenów CD133 i CD117 ( $r = 0,51$ ). Zbliżony współczynnik korelacji stwierdzono dla ekspresji antygenów CD133 i CD123, CD117 i CD71 oraz CD90 i CD19 (odpowiednio:  $r = 0,50$ ;  $0,50$ ;  $0,48$ ).

W grupie próbek z krwi pępowinowej stwierdzono silną korelację dodatnią między odsetkiem komórek CD34<sup>+</sup> z koekspresją antygenów CD33 i CD117 ( $r = 0,70$ ) oraz CD19 i CD2 ( $r = 0,73$ ), a silną korelację ujemną – w przypadku ekspresji antygenów CD33 i CD19 oraz CD33 i CD2 (odpowiednio:  $r = -0,64$ ;  $r = -0,59$ ).

Szczegółowe dane dotyczące zależności między badanymi antygenami w poszczególnych grupach przedstawiono w tabelach 3 i 4.

## Omówienie

W prezentowanej pracy opisano wyniki porównania ilościowych i fenotypowych cech komórek krwiotwórczych CD34<sup>+</sup> uzyskanych z krwi

pępowinowej i z pojedynczego produktu leukaferazy zdrowych dawców mobilizowanych G-CSF.

Przedstawiona ilościowa ocena wskaźników komórkowych preparatu krwi pępowinowej potwierdza jej ograniczoną przydatność jako materiału przeszczepowego u osób dorosłych. Znacznie lepszym źródłem komórek CD34<sup>+</sup> jest produkt leukaferazy; niektórzy autorzy podają, że do uzyskania dawki komórek CD34<sup>+</sup> w ilości 2,5  $\times 10^6$ /kg m.c. (dla ważącego 75 kg pacjenta) wystarcza pojedyncza procedura leukaferazy [7].

Jakościowa ocena subpopulacji komórek CD34<sup>+</sup> w obydwu grupach wykazała znikome odsetki komórek zróżnicowanych w kierunku linii limfoidalnej B i T charakteryzujące się koekspresją antygenów CD19 i CD2. Podobne wyniki zostały przedstawione przez innych autorów [2, 11–13]. We krwi pępowinowej stwierdzono wyższy odsetek komórek o fenotypie CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>, przy czym ekspresja antygenu CD10 była słaba, co może świadczyć o niewielkiej gęstości tego antygenu na analizowanych komórkach.

Ocena komórek różnicujących się w kierunku linii erytroidalnej, wykazujących silną ekspresję antygenu CD71 (CD71<sup>high</sup>) wykazała, że lepszym ich źródłem są obwodowe komórki krwiotwórcze po stymulacji G-CSF, gdzie wykryto 19,2% komórek CD34<sup>+</sup> z silną ekspresją tego antygenu. Rozbieżności w ocenie ekspresji antygenu CD71 podawane przez innych autorów są bardzo duże: w mobilizowanej krwi obwodowej od 17% [14] do 70% [3]; we krwi pępowinowej od 20% [15] do 97% [12]. Ekspresja antygenu CD71 pełniącego funkcję receptora dla transferyny może również świadczyć o stanie proliferacyjnym komórek CD34<sup>+</sup> ze względu na większe zapotrzebowanie na żelazo komórek dzielących się. W przedstawionej pracy stwierdzono wyższy odsetek komórek CD34<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> we krwi obwodowej (PL: 95,6%; KP: 83,3%), co może sugerować, że komórki macierzyste CD34<sup>+</sup> pochodzące z krwi obwodowej w wyższym odsetku znajdują się w fazie proliferacji. Może to również wynikać z wyższego odsetka komórek ukierunkowanych do linii erytroidalnej.



**Tabela 2.** Ekspresja badanych antygenów wyrażona jako odsetek komórek CD34<sup>+</sup> w poszczególnych grupach**Table 2.** The percentage of CD34<sup>+</sup> cells positive for the antigen tested in cord blood and product of leukapheresis

	Krew pępowinowa (Cord blood) n = 21			Produkt leukaferazy (Product of leukapheresis) n = 22			
	średnia (mean) zakres (range) %	SD	mediana (median)	średnia (mean) zakres (range) %	SD	mediana	p
CD133	88,0 68,0–96,0	7,1	91,0	87,7 79,0–98,0	5,0	88,0	0,845546
CD90	27,3 10,0–64,0	13,8	26,0	52,0 28,0–87,0	17,0	47,0	0,000006
CD117	90,5 55,0–98,0	9,1	94,0	94,0 86,0–98,0	3,2	95,0	0,090078
CD123	78,6 64,0–92,0	7,7	79,0	71,7 31,0–96,0	15,1	76,0	0,071087
CD135	73,3 37,0–95,0	16,2	76,0	74,7 13,0–97,0	20,8	77,0	0,801757
CD38	84,4 75,0–90,0	4,9	86,0	90,3 79,0–97,0	5,4	92,0	0,000498
CD33	85,2 52,0–98,0	12,0	89,0	81,5 37,0–100,0	16,0	87,0	0,399066
CD10	30,2 14,0–49,0	8,1	28,0	15,1 4,0–33,0	7,9	13,0	0,000001
CD19	5,3 1,0–13,0	3,2	5,0	5,1 0,0–10,0	2,9	5,0	0,878797
CD2	11,6 3,0–31,0	7,5	9,0	8,4 1,0–28,0	7,3	7,0	0,154371
CD71	83,3 55,0–97,0	11,3	87,0	95,6 84,0–100,0	4,2	97,0	0,000034
CD71 <sup>high</sup>	16,1 8,0–21,0	3,5	16,0	19,2 13,0–23,0	3,0	20,0	0,003478
CD38(–)CD133(+)	14,5 8,0–24,0	4,2	14,0	8,8 2,0–20,0	5,2	7,0	0,000316

Fenotypowa ocena subpopulacji komórek ukierunkowanych w stronę mielopoezy CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> nie wykazała istotnych statystycznie różnic między odsetkami takich komórek uzyskanymi z krwi pępowinowej i z krwi obwodowej osób dorosłych. Wysoki odsetek komórek CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> (> 80%) w preparacie KP i PL dowodzi dominacji komórek ukierunkowanych mieloidalnych. Podobne wyniki są prezentowane w pracach innych badaczy, gdzie odsetek ten waha się od 70% do 80% komórek CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> we krwi pępowinowej [2, 11, 15], oraz od 70% do 96% w produkcie leukaferazy, chociaż Bender et al. [3] podają, że odsetki komórek mieloidalnych o fenotypie CD34<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> wynoszą 23% we krwi pępowinowej i 12% we krwi obwodowej po mobilizacji. Wyjaśnieniem przyczyny uzyskania tak małych wartości może być użycie w tym badaniu przeciwciała anti-CD33 znakowanego fluoresceiną (FITC). Z obserwacji własnych wynika (dane nieopublikowane), że do wykrywania antyge-

**Tabela 3.** Zależności między oznaczanymi antygenami w populacji komórek CD34<sup>+</sup> wyrażone w postaci współczynnika korelacji r na poziomie istotności p < 0,05 w grupie z próbkami leukaferazy od osób zdrowych**Table 3.** Relations between antigens expression on CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors product of leukapheresis as correlation coefficient (significance level: p < 0.05)

Korelacja dodatnia (Positive correlation)	
	wartość współczynnika r (r coefficient value)
CD133 vs. CD117	0,51
CD133 vs. CD123	0,50
CD90 vs. CD19	0,48
CD117 vs. CD71	0,50

nów występujących w małej gęstości na badanych komórkach (a do takich należy antygen CD33 na komórkach CD34<sup>+</sup>) lepiej używać przeciwciał znakowanych fikoerytryną (PE).

W przedstawionej pracy ekspresja receptorów dla cytokin flt3-L, SCF i IL-3 (odpowiednio CD135, CD117 i CD123) na komórkach CD34<sup>+</sup> nie różni się w badanych grupach i wynosi ok. 74% dla CD135, ok. 92% dla CD117 i ok. 75% dla CD123.

Podobny do uzyskanego w tej pracy odsetek komórek CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> we krwi pępowinowej stwierdzili inni autorzy [5, 16], jednak istnieją również doniesienia o braku ekspresji tego receptora lub bardzo niskim odsetku komórek CD135<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> we krwi obwodowej po mobilizacji czynnikiem wzrostu, co może być spowodowane heterogennością badanej grupy (zdrowi dawcy, chorzy na raka jajnika, raka piersi, chłoniaki) [17].

Większość autorów jest zgodna co do obecności dużego odsetka komórek CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> i to zarówno w produkcie leukaferazy uzyskanym po mobilizacji G-CSF, jak i we krwi pępowinowej [12, 15, 18].

W badaniach własnych obecność receptora dla IL-3 (CD123) wykryto na ok. 75% komórek krwiotwórczych CD34<sup>+</sup> w preparatach KP i PL. Liczba doniesień dotyczących ekspresji tego antygenu na komórkach krwiotwórczych jest ograniczona. Według Miyamoto et al. 77% komórek

CD34<sup>+</sup> wykazuje koekspresję antygenu CD123 we krwi pępowinowej [19].

Ekspresja antygenu CD90 (Thy1) w puli komórek CD34<sup>+</sup> różniła się znacząco w badanych grupach i wynosiła 52% w PL i 27% w KP. Uważa się, że komórki o fenotypie CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> zawierają szczególnie dużo niezróżnicowanych komórek krwiotwórczych decydujących o długotrwałym efekcie przeszczepienia [7]. Kontrowersje dotyczące ekspresji tego antygenu na komórkach macierzystych w porównywanych grupach dotyczą zarówno krwi obwodowej po mobilizacji (12–42%) [18, 20, 21], jak i krwi pępowinowej (10–53%) [11, 12, 15, 22] i mogą wynikać zarówno z użycia przeciwciał znakowanych różnymi fluorochromami [18, 21], jak i z możliwości, że w trakcie mobilizacji G-CSF obserwuje się obniżenie poziomu ekspresji tego antygenu [20].

Badania nad krwiotwórczymi komórkami macierzystymi wykazują, że potencjał do trwałego wszczepienia jest uzależniony od występowania subpopulacji CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>. Obserwacje własne dowodzą, że we krwi pępowinowej znajduje się znacząco wyższy odsetek komórek CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Dodatkowo, trójkolorowa analiza cytometryczna wykazała, że komórki te zarówno we krwi pępo-

**Tabela 4.** Zależności między oznaczanymi antygenami w populacji komórek CD34<sup>+</sup> wyrażone w postaci współczynnika korelacji r na poziomie istotności  $p < 0,05$  w grupie krew pępowinowa

**Table 4.** Relations between antigens expression on cord blood CD34<sup>+</sup> cells as correlation coefficient (significance level:  $p < 0,05$ )

Korelacja dodatnia (Positive correlation)		Korelacja ujemna (Negative correlation)	
	wartość współczynnika r (r coefficient value)		wartość współczynnika r (r coefficient value)
CD133 vs. CD117	0,45	CD117 vs. CD19	-0,48
CD38 vs. CD123	0,61	CD117 vs. CD 2	-0,53
CD33 vs. CD117	0,70	CD33 vs. CD19	-0,64
CD10 vs. CD19	0,52	CD33 vs. CD 2	-0,59
CD10 vs. CD2	0,56		
CD19 vs. CD2	0,73		
CD90 vs. CD123	0,56		

**Tabela 5.** Porównanie danych dotyczących ekspresji antygenu CD133 na komórkach CD34<sup>+</sup> pochodzących z różnych źródeł

**Table 5.** CD133 antigen expression on CD34<sup>+</sup> cells from different sources

Autor (Author)	Szpik kostny (Bone marrow)	Krew obwodowa po stymulacji czynnikami wzrostu (Mobilized peripheral blood)	Krew pępowinowa (Cord blood)
Yin et al. [9]	70% (n = 2)	55% (n = 3)	35% (n = 2)
De Wynter et al. [25]	36% (n = 7)	75% (n = 13)	51% (n = 9)
Matsumoto et al. [5]	48% (n = 2)	89% (n = 4)	83% (n = 18)
Passino et al. [23]			79% (n = 16)
Badania własne		87,7% (n = 22)	88% (n = 21)

n – liczba badanych.

n – number of patients.

winowej, jak i obwodowej – wykazują koekspresję antygenu CD133. Uważa się, że wykryty w 1997 r. na komórkach krwiotwórczych u ludzi antygen CD133 (AC133), nieobecny na dojrzałych komórkach układu krwiotwórczego [8, 9] jest charakterystyczny dla wczesnych komórek macierzystych i progenitorowych [10, 23]. Badania *ex vivo* dowodzą, że wyselekcjonowane komórki CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> dają początek wszystkim liniom komórkowym hematopoezy (mieloidalnej, erytroidalnej i megakariocytowej), a komórki CD34<sup>+</sup>CD133<sup>(-)</sup> różnicują się głównie w kierunku linii erytroidalnej i megakariocytowej [24]. Ponadto Pasino et al. wykazali, że w populacji komórek CD133<sup>+</sup> pochodzących z krwi pępowinowej znajduje się więcej wczesnych komórek krwiotwórczych niż w populacji komórek CD34<sup>+</sup> [23]. Niektórzy autorzy donoszą również o obecności antygenu CD133 na komórkach prekursorowych śródbłónka [26, 27], co może sugerować istnienie tzw. heman-

gioblastów, czyli wspólnych prekursorów dla komórek śródbłónka i układu krwiotwórczego [28].

W tabeli 5 przedstawiono doniesienia innych autorów dotyczące ekspresji antygenu CD133 na komórkach macierzystych CD34<sup>+</sup> pochodzących ze szpiku, z krwi obwodowej stymulowanej czynnikami wzrostu i z krwi pępowinowej. W badaniach własnych odsetek komórek macierzystych CD34<sup>+</sup> wykazujących koekspresję antygenu CD133 we krwi pępowinowej jest podobny do prezentowanego przez innych autorów analizujących zbliżone liczebnie grupy [5, 23].

W przedstawionej pracy potwierdzono istnienie różnic immunofenotypu komórek CD34<sup>+</sup> uzyskanych z krwi pępowinowej w porównaniu z krwią obwodową. Stwierdzenie wyższego odsetka komórek CD38<sup>-</sup> oraz CD38<sup>-</sup>133<sup>+</sup> we krwi pępowinowej może tłumaczyć dużą przydatność kliniczną tego materiału, mimo uzyskiwania niewielkiej liczby krwinek białych i komórek CD34<sup>+</sup>.

## Piśmiennictwo

- [1] Wiktor-Jędrzejczak W, Urbanowska E, Rokicka M, Król M, Król M, Torosian T, Tomaszewska A, Paluszewska M, Gronkowska A: Wstępna ocena możliwości wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych pozyskanych od różnych dawców krwi pępowinowej do jednoczesnego przeszczepienia u biorców dorosłych. *Post Biol Kom* 2003, 30, 21, 139–147.
- [2] Belvedere O, Feruglio C, Mlangone W, Bonora M, Donini A, Dorotea L, Tonutti E, Rinaldi C, Pittino M, Baccarani M, Del Frate G, Biffoni F, Sala P, Hilbert DM, Degrossi A: Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *Blood Cells Mol Dis* 1999, 25, 141–146.
- [3] Bender JG, Unverzag K, Walker DE, Lee W, Smith S, Williams S, Van Epps DE: Phenotypic analysis and characterization of CD34<sup>+</sup> cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1994, 70, 10–18.
- [4] Körbling M, Anderlini P: Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 2001, 98, 2900–2908.
- [5] Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie J, Yamada T, Tani Y, Shibata H, Nakano T: *In vitro* proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells* 2000, 18, 196–203.
- [6] Fu S, Liesveld J: Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000, 14, 205–218.
- [7] Menendez P, Perez-Simon JA, Mateos MV, Caballero MD, Gonzalez M, San-Miguel JF, Orfao A: Influence of the different CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cell subsets infused on clinical outcome after non-myeloablative allogeneic peripheral blood transplantation from human leucocyte antigen-identical sibling donors. *Br J Haematol* 2002, 119, 135–143.
- [8] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW: A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997, 90, 5013–5021.
- [9] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997, 90, 5002–5012.
- [10] Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA: Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2004, 104, 1648–1655.
- [11] Mayani H, Lansdorp PM: Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998, 16, 153–165.
- [12] Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino ACW, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring HJ: Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 1997, 90, 111–125.
- [13] Tjønnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T: Characterization of CD34<sup>+</sup> peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1994, 84, 2795–2801.
- [14] Bender JG, Unverzag KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB: Identification

- and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 1991, 77, 2591–2596.
- [15] **Ziegler BI, Thoma SJ, Lamping CP, Valtieri M, Müller R, Samoggia P, Bühring HJ, Peschle C, Fliedner TM:** Surface antigen expression on CD34<sup>+</sup> cord blood cells: comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution (LD) RT-PCR of chymopapain-treated or untreated cells. *Cytometry* 1996, 25, 46–57.
- [16] **Ebihara Y, Mika W, Takahiro U, Ming-Jiang X, Atsushi M, Ryuhei T, Mamoru I, Hideo M, Shigetaka A, Tatsutoshi N, Kohichiro T:** Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells expressing Flk2/Flt3. *Br J Haematol* 2002, 119, 525–534.
- [17] **Aurran-Schieinitz T, Imbert AM, Humeau L, Bardin F, Charbord P, Chabannon C:** Early progenitor cells from human mobilized peripheral blood express low levels of the flt3 receptor, but exhibit various biological responses to flt3-L. *Br J Haematol* 1999, 106, 357–367.
- [18] **Burger PE, Coetzee S, McKeenhan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL:** Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood* 2002, 100, 3527–3535.
- [19] **Miyamoto K, Tsuji K, Maekawa T, Asano S, Nakahata T:** Inhibitory effect of interleukin 3 on early development of human B-lymphopoiesis. *Br J Haematol* 2001, 114, 690–697.
- [20] **Tsuchiya S, Kikuta A, Shimizu Y, Takano N, Ito E, Watanabe A, Imaizumi M, Konno T:** Decrease in Thy-1 expression on peripheral CD34 positive cells induced by G-CSF mobilization. *J Exp Med* 1997, 182, 157–162.
- [21] **de Boer F, Dräger AM, Van Haperen MJ, van der Wall E, Kessler F, Huijgens PC, Pinedo HM, Schuurhuis GJ:** The phenotypic profile of CD34-positive peripheral blood stem cells in different mobilization regimens. *Br J Haematol* 2000, 111, 1138–1144.
- [22] **Watt SM, Bühring HJ, Rappold I, Chan JY, Lee-Prudhoe J, Jones T, Zannettino AC, Simmons PJ, Doyonnas R, Sheer D, Butler LH:** CD164, a novel sialomucin on CD34<sup>+</sup> and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. *Blood* 1998, 92, 849–866.
- [23] **Pasino M, Lanza T, Marotta F, Scarso L, De Biasio P, Amato S, Corcione A, Pistoia V, Mori PG:** Flow cytometric and functional characterization of AC133<sup>+</sup> cells from human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000, 108, 793–800.
- [24] **Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, Tani Y, Nakano T:** Differences between peripheral blood and cord blood in the kinetics of lineage-restricted hematopoietic cells: implications for delayed platelet recovery following cord blood transplantation. *Stem Cells* 2003, 21, 143–151.
- [25] **de Wynter EA, Emmerson AJB, Testa NG:** Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Baillière's Clin Haematol* 1999, 12, 1–17.
- [26] **Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S:** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000, 95, 952–958.
- [27] **Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S:** VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34<sup>+</sup> lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003, 101, 168–172.
- [28] **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM:** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275, 964–967.

### Adres do korespondencji:

Maria Aleksandra Król  
Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM  
ul. Banacha 1a  
02-097 Warszawa  
makroll@post.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.10.2004 r.  
Po recenzji: 26.04.2005 r.  
Zaakceptowano do druku: 26.04.2005 r.

Received: 28.10.2004  
Revised: 26.04.2005  
Accepted: 26.04.2005