

# Cercetări și perspective privind terapia cu celule stem din sângele recoltat din cordonul ombilical pentru pacienții cu diabet

## Research and perspectives for stem cell therapy using human umbilical cord blood in diabetes

Cătălina Monica Pena<sup>1</sup>, O.G. Olaru<sup>2</sup>, Raluca Mihaela Pircălabu<sup>1</sup>, Ileana Răducanu<sup>1</sup>

1. Institutul Național de Gerontologie și Geriatrie "Ana Aslan" București,  
Secția de cercetare "Biologia Îmbătrânirii"  
2. Spitalul de Urgență "Sf. Ioan", Maternitatea Bucur

### Abstract

*In the recent years human umbilical cord blood (HUCB) – a valuable alternative to the use of other stem cell sources - has emerged as an attractive tool for cell based therapy. A rising number of studies show potential for further application in treatment of non-hematopoietic diseases. The ex vivo expansion of hematopoietic stem cells is a very promising approach for different clinical applications. The topic of this paper is to emphasize the importance of the potential for converting HUCB - derived stem cells*

*into insulin producing beta-cells. In vitro expansion prior to transplantation appears to be the only way to increase the low number of stem cells required for appropriate number of islet beta-cells in a single patient.*

*Even if it is not likely that HUCB contains pancreatic progenitors, there is possible that HUCB stem cells to be able to differentiate toward pancreatic beta cells.*

**Keywords:** stem cell, transplant, umbilical cord blood, diabetes

### Rezumat

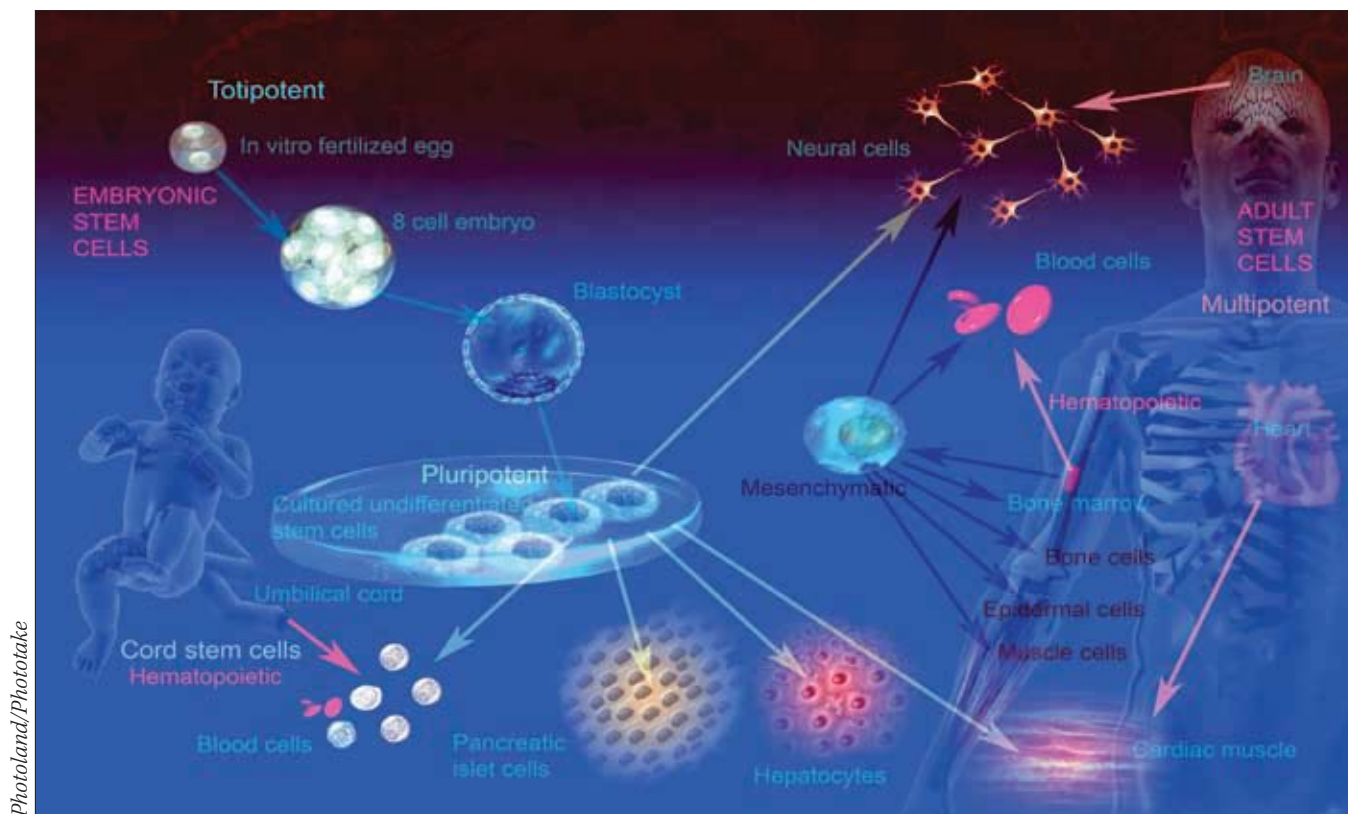
În ultimii ani, sângele din cordonul ombilical uman - o alternativă valoroasă pentru obținerea celulelor stem - apare ca un instrument atractiv pentru terapia celulară. Un număr mare de studii arată un potențial pentru aplicații viitoare în boli nehematopoietice. Stimularea în vederea proliferării acestor celule și transplantarea lor reprezintă un instrument terapeutic promițător, dar insuficient studiat. Din aceste motive, potențialul de transformare a celulelor stem derivate din sângele din cordonul ombilical în celule secretante de insulină este obiectivul principal de cercetare în acest material. Deși nu s-a demonstrat cu certitudine faptul că sângele din cordonul ombilical conține progenitori pancreatici, este posibil ca celulele stem din sângele ombilical să aibă capacitatea de a se diferenția în acest tip de celule. Deoarece este necesar un număr mare de celule beta-insulare pentru un singur pacient, iar celulele stem multipotente din sângele din cordonul ombilical au o concentrație mică, este necesară proliferarea in vitro înainte de transplant.

**Cuvinte-cheie:** celule stem, transplant, cordon ombilical, diabet

Sângele din CO, cu abundența sa reală, procedura de colectare simplă, neinvazivă și fără implicații de natură etică, reprezintă o alternativă valoroasă pentru celelalte surse folosite pentru obținerea celulelor stem<sup>(1,2)</sup>. Avantajele biologice ale celulelor

stem din sângele de CO uman sunt chiar mai evidente. Colectarea se face imediat după ce copilul s-a născut, ceea ce înseamnă că celulele stem din sângele CO sunt printre cele mai tinere tipuri de celule care pot fi izolate de la o ființă umană. Acest

lucru este important, întrucât celulele de la donorii adulți pot avea o calitate alterată a ADN-ului și cauzată de factori endogeni și de mediu care au acționat de-a lungul vieții. Mai mult, aceste celule au un risc scăzut de contaminare virală cauzată de o expunere minimă a donurilor la virusuri în timpul vieții prenatale. Unul din avantajele majore ale celulelor din sângele din CO în comparație cu celulele stem din sângele periferic sau măduva osoasă ar putea fi incidența redusă a rejektului de greșă, care poate apărea ca rezultat al transplantării de celule active din punct de vedere imunologic. Totuși, comparativ cu transplantul de măduvă osoasă, incidența de rejecție a greșei este mai mică în cazul transplantării de sânge din CO și acest lucru se poate datora unui număr mai mic de limfocite T, imaturității celulare și funcției reduse a celulelor dendritice. Ca o strategie concomitentă, depleția de limfocite și alte celule imune ar putea



Photoland/Phototake

în viitor să limiteze incidența bolii greșă contra gazdă.

S-au obținut deja unele succese în ceea ce privește inducerea diferențierii celulelor stem embrionare de șoarece în diferite tipuri celulare, și anume celule musculare cardiace, celule de mușchi neted, neuroni, hepatocite și celule secretante de insulină. De curând s-a raportat diferențierea celulelor stem embrionare umane în neuroni, cardiomiocite și celule secretante de insulină folosind o cultură de corpi embrioizi. Una din provocările majore în cercetarea din acest domeniu este de a crește numărul celulelor stem umane transplantabile prin stimularea fracțiunii precursorilor celulare a celulelor stem hematopoietice *ex vivo*<sup>(9,10,11)</sup>. Multiplicarea *ex vivo* a celulelor stem hematopoietice este o modalitate extrem de promițătoare pentru diferite aplicații clinice. Ca urmare, îmbogățirea celulelor stem din sângele din CO și transplantarea lor reprezintă un instrument terapeutic promițător, dar încă insuficient studiat.

Pașii importanți către dezvoltarea cu succes a unei terapii celulare bazate pe celule stem embrionare includ stabilirea unui protocol care ar permite celulelor stem să se diferențieze în tipuri celulare, ceea ce presupune că o linie celulară să poată fi separată din populația celulară îmbogățită, dar heterogenă. Printre diferitele modalități terapeutice, terapia

celulară se remarcă în mod special printr-un potențial curativ încurajator. Pentru aceste motive, potențialul de transformare a celulelor stem derivate din sângele din CO în celule beta-pancreatice secretante de insulină este foarte important. În strânsă legătură cu aplicația clinică a celulelor stem din CO pentru tratamentul diabetului zaharat, observația că celulele derivate din măduva osoasă pot deveni celule producătoare de insulină este de importanță enormă. Deoarece celulele stem somatice derivate din sângele din CO etalează cei mai mulți markeri celulari și proprietăți, ca și celulele progenitoare adulte multipotente, s-ar putea considera că sângele din CO ar putea conține celule cu potențial de dezvoltare în celule secretante de insulină.

Identificarea celulelor progenitoare endocrine pancreatice este o țintă foarte grea. Markerii implicați în dezvoltarea pancreasului endocrin și neogeneza celulelor beta sunt intens folosiți pentru acest scop. Hitherto, un studiu dus la bun sfârșit de Pessina et col. a investigat exprimarea markerilor progenitorilor endocriini pancreatici la nivelul celulelor din sângele din CO uman<sup>(3)</sup>. Aceștia au arătat că celulele nediferențiate din CO au fost pozitive pentru nestină, cytokeratina 19 și factorii de transcripție, cum ar fi neurogenina-3 (Ngn-3), care

sunt considerați importanți pentru diferențierea celulelor beta pancreatice. Acest marker controversat - Nestina și factorii de transcripție sunt, de asemenea, secretați de celulele neuronale și progenitorii lor și au fost detectați deja în sângele din CO. Deși nu s-a demonstrat încă faptul că sângele din CO conține progenitori pancreatici, este posibil ca celulele stem din sângele ombilical să aibă capacitatea de a se diferenția în celule pancreatice. Candidatele pentru precursorii pancreasului endocrin au un fenotip similar cu celulele stem neuronale și hepatice, acestea putând fi deja reproduse din celule ale sângelui ombilical. De aceea, viitoare experimente *in vivo* și *in vitro* ar putea avea ca rezultat această diferențiere în celule pancreatice.

Diferite molecule, așa cum sunt peptida glucagon-like-1, beta-celulina, nicotinamida, gastrina, factorul de creștere epidermal-1 și hormonii tiroidieni, joacă roluri majore în inițierea regenerării endogene insulare, la pacienții cu diabet. Unele biomolecule, ca de exemplu beta-celulina, un membru al familiei factorilor de creștere epidermală (EGF), sunt cunoscute că declanșează *in vivo* și *in vitro* replicarea sau regenerarea insulelor pancreatice din celulele stem intra-insulare sau ductale non-pancreatice.

Câteva studii *in vivo* au investigat efectul transplantării celulelor din CO uman la

animale diabetice. Unele dintre aceste studii au arătat că transplantarea acestor celule a avut ca efect îmbunătățirea nivelurilor sangvine ale glucozei și supraviețuirea șoarecilor diabetici. Mai mult de atât, la șoarecii tratați cu sânge din CO s-a observat o ameliorare a hipertrofiei glomerulare și a dilatației tubulare, complicații frecvente atribuite diabetului<sup>(4)</sup>. În alt studiu s-a arătat că transplantarea celulelor din sângele ombilical uman la șoareci cu diabet tip I a întârziat manifestarea fenomenelor de autoimunitate (insulita) și a îmbunătățit nivelurile sangvine ale glucozei. Autorii au raportat că șoarecii transplantați nu au avut nici o manifestare clinică sau histologică specifică bolii grefă contra gazdă, în ciuda omisiunii terapiei imunosupresive<sup>(5)</sup>. Pentru că persistența celulelor umane a fost confirmată doar în splina câtorva șoareci și nu au putut fi detectate în pancreas sau alte organe, rămâne neclar căruia mecanism i se datorează îmbunătățirea obținută.

Un raport recent s-a concentrat pe capacitatea sângelui din CO uman de a genera celule pancreatice insulare in vivo<sup>(6)</sup>. După transplantarea intravenoasă a sângelui de CO la șoarecii NOD/SCID, s-au găsit în insulele pancreatice ale șoarecilor celule beta insulare de origine umană. Deși originea umană și potențialul de producere a celulelor secretante de insulină sunt aproape indiscutabile, mecanismul prin care are loc transformarea rămâne discutabil. Celulele din sângele CO uman sunt capabile să secrete mediatori critici pentru migrare, proliferare și fenomenul de homing pentru progenitorii endogeni și să participe la un proces de neovascularizare

pentru țesuturile ischemice sau vătămate.

Din cauza faptului că este necesar un număr mare de celule beta-insulare pentru un singur pacient și celulele stem multipotente din CO au concentrație mică, este necesară proliferarea in vitro înainte de transplant. Capacitatea celulelor sangvine din CO de a se multiplica in vivo și in vitro pare să fie satisfăcătoare atât pentru generarea unui număr suficient de celule, cât și pentru menținerea lor de-a lungul vieții pacientului.

Sunt două strategii care merită să fie studiate. Cea mai simplă abordare este transplantarea directă a celulelor stem cultivate sau a celulelor precursoră diferențiate parțial. Celulele din CO au capacitatea de a migra către diferite țesuturi, trăsătură ce poate fi folosită pentru acest scop. Cu toate acestea, mecanismele exacte care dirijează fenomenul de homing al celulelor în pancreas și care determină fenotipul celulelor grefate nu este cunoscut încă.

Houtari et al. au sugerat rolul beta-celulei în regenerarea și neogeneza insulară. Funcția unor biomolecule din familia factorilor proteici de creștere epidermală (EGF), ca de exemplu beta-celulina și activina A în timpul dezvoltării pancreasului, este bine documentată. S-a arătat că un alt agent promițător - nicotinamida - protejează insulele pancreatice de inflamație și stimulează diferențierea endocrină a celulelor beta-pancreatice de șobolan in vivo. Cercetătorii au folosit aceste celule din sângele CO pentru a investiga dacă ele pot juca un rol în scăderea glicemiei prin protecția insulelor pancreatice într-un pancreas bolnav sau agresat. S-a arătat că transplantarea intravenoasă a

unei fracțiuni de celule mononucleare din CO la șoarecii NOD a condus la o scădere semnificativă a nivelului glicemiei și la o reducere semnificativă a procesului inflamator insular. Investigații ulterioare conduc la concluzia că aceste celule ameliorează diabetul zaharat tip I prin protejarea celulelor pancreatice endocrine la șoarecii NOD. Beneficiile obținute nu se limitează numai la diabetul de tip I, aceleași rezultate obținându-se și pentru diabetul de tip II. După transplantarea celulelor mononucleare din sângele CO uman la șoareci obezi cu evoluție spontană a diabetului tip II, șoarecii au manifestat o ameliorare a nivelurilor glicemiei, a patologiei renale, precum și o îmbunătățire a ratei de supraviețuire.

Naruse et al. au cercetat dacă obținerea neovascularizației terapeutice folosind celule din sângele CO are și implicații asupra ameliorării neuropatiei diabetice. Rezultatele obținute sugerează faptul că transplantarea celulelor din CO poate fi un tratament eficient pentru neuropatia diabetică<sup>(7)</sup>. De aceea, celulele stem din CO pot oferi o altă opțiune a terapiei cu celule stem în diabetul zaharat. Având ca premisă faptul că celulele din sângele CO și-au arătat potențialul de diferențiere în celule beta-insulare, obiectivele viitoare urmăresc identificarea unei populații celulare corespunzătoare și dezvoltarea unor metode pentru diferențierea celulelor stem din CO uman în celule insulare beta-pancreatice. Deși, în momentul actual, cercetarea acestor celule pentru un potențial tratament celular al diabetului este în stadiul timpuriu<sup>(12)</sup>, suntem de părere că dovezile prezentate aici aduc motive în plus de optimism.

#### Bibliografie selectivă

1. Method of collecting placental stem cells. US Patent 7045148 issued on May 16, 2006. Inventor Robert J. Hariri.
2. Isolation and preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood. US Patent Issued on October 8, 2002.
3. Pessina A., Eletti B., Croera C. et al. Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004. 323:315-322.
4. Ende N., Chen R., Reddi A.S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004.321:168-171.
5. Ende N., Chen R., Reddi A.S. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004.325:665-669.
6. Yoshida S., Ishikawa F., Kavano N. et al. Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo. *Stem cells* 2005.23:1409-1416.
7. Naruse K., Hamada Y., Nakashima E. et al. Cord blood stem cells: Therapeutic neovascularization, using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005.54:1823-1828.
8. Manotaya S., Elias S., Lewis D. Et al. Evaluation of a culture system for enrichment of CD 34+ hematopoietic progenitor cells present in maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 17:90,2002
9. Chivu M., Diaconu C., Brașoveanu L. et al. Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. *J.Cell.Mol.Med.*2002.6-4:609-620
10. Madkaikar M., Ghosh K., Gupta M. et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta Haematologica* 2007; 118:153-159.
11. Chivu M., Diaconu C., Bleotu C. et al. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J.Cell.Mol.Med.*2004.8-2:223-231.
12. Shiroi A., Yoshikawa M., Yokota H. et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione. *Stem Cells* 2002;20:284-292.