

MARIUSZ Z. RATAJCZAK, EWA ZUBA-SURMA, JANINA RATAJCZAK

Komórki macierzyste – blaski i cienie

Stem cell therapeutics – hope and concerns

Katedra Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin
Instytut Komórki Macierzystej, Centrum Rakowe im. Jamesa Grahama Browna, Uniwersytet
Louisville, USA

STRESZCZENIE

Strategie lecznicze oparte o wykorzystanie terapeutyczne komórek macierzystych stwarzają nadzieje na opracowanie efektywnych metod leczniczych dla szeregu, do tej pory nieuleczalnych innymi metodami, schorzeń. Noworozwijająca się dziedzina nauk medycznych, jaką jest medycyna regeneracyjna wiąże duże nadzieje z postępami w wykorzystaniu komórek macierzystych nie tylko w hematologii, ale również w leczeniu np. zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu, uszkodzeń rdzenia kręgowego, oparzeń skóry, cukrzycy, czy też choroby Parkinsona. Szersze potencjalne wykorzystanie komórek macierzystych w medycynie ciągle budzi jednak w niektórych środowiskach spore emocje natury etycznej. Dlatego też celem niniejszej pracy jest krytyczne przedstawienie obecnego stanu badań nad wykorzystaniem różnych źródeł komórek macierzystych w hematologii.

SŁOWA KLUCZOWE: Komórki macierzyste – Hematologia – Strategia terapeutyczna

SUMMARY

Various therapeutic strategies employing stem cells have been proposed as the alternative therapies for of multitude diseases, difficult to treat using standard methods. Therefore rapidly evolving regenerative medicine creates a hope that stem cells that are already sucessfully employed in hematological transplantology could be also employed to treat injured organs such as myocardium after heart infarction, brain after stroke, spinal cord after mechanical injury as well as to treat diabetes and Parkinson disease. Stem cell therapies, in particular those utlizing embryonic stem cells are subject of controversies and debates. This review will uopadte a current status on development of stem cell based therapies so that they could be sucesfully employed in the hematology.

KEY WORDS: Stem cells – Hematology – Hematological strategies

WSTĘP

Dzięki postępom nauki, u progu trzeciego tysiąclecia człowiek sięgnął po technologie, których efekty działania do tej pory były przypisywane istotom najwyższym. Rozwój fizyki doprowadził do zgłębienia tajników energii jądrowej, a rozwój nauk

biologicznych i genetyki przybliżył z kolei tajemnice powstawania organizmów i ich regeneracji, wprowadzając tym samym ludzkość w fascynujący świat komórek macierzystych.

Mianem komórki macierzystej określa się komórkę posiadającą zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się w komórki potomne. Definicja ta jest jednak zbyt uproszczona. Wyróżniamy, bowiem wiele rodzajów komórek macierzystych, różniących się pomiędzy sobą potencjałem proliferacyjnym oraz zdolnością do różnicowania. W rzeczywistości komórki macierzyste są bardzo różnorodne i trudno je jednoznacznie opisać jedną wspólną definicją.

Puła komórek macierzystych utrzymuje w równowadze liczbę komórek somatycznych w organizmie, a tym samym jest odpowiedzialna za odnawianie zużywających się z czasem komórek somatycznych oraz za regenerację narządów i tkanek. Z tego powodu komórkom macierzystym poświęca się coraz więcej uwagi i uważa się, że technologie prowadzące do optymalizacji ich klinicznego wykorzystania staną się kluczem do długowieczności, w rozwijającej się jako nowa dyscyplina kliniczna medycynie regeneracyjnej.

Założeniem medycyny regeneracyjnej jest wykorzystanie komórek macierzystych w terapii uszkodzonych narządów i tkanek. Uważa się, że przeszczepianie całych narządów będzie w przyszłości coraz częściej zastępowane przeszczepami zawiesiny komórek macierzystych, ukierunkowanych dla danego narządu, które będą miały za zadanie regenerację/odbudowę uszkodzonych organów. Szczególne nadzieje na wykorzystanie terapeutyczne komórek macierzystych wiąże się z takimi schorzeniami, jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, parkinsonizm, cukrzyca, dystrofie mięśniowe, toksyczne uszkodzenia wątroby i nerek. Wydaje się, że człowiek faktycznie zaczyna sięgać coraz bardziej po upragniony klucz do długowieczności.

Komórki macierzyste – definicja, hierarchia i różnorodność

Najbardziej charakterystyczną cechą komórki macierzystej jest jej zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się w coraz to bardziej ukierunkowane narządowo komórki potomne. Stąd też w przedziale komórek macierzystych istnieje duży stopień hierarchii i zróżnicowania od tych najbardziej prymitywnych rozwojowo do bardziej ukierunkowanych tkankowo/narządowo.

Dorosły ssak rozwija się z najwcześniejszej komórki macierzystej, jaką jest zapłodniona komórka jajowa (zygota). Zygota jest komórką macierzystą totipotencjalną (KMT), czyli taką, która zgodnie z definicją daje początek zarówno komórkom łożyska jak i zarodka. Zygota, jako KMT, może więc dać początek nowemu osobnikowi po implantacji w macicy. KMT na pierwszych etapach rozwoju embrionalnego różnicuje się natychmiast w komórki macierzyste pluripotencjalne (PKM), które występują m.in w stadium moruli (stadium zarodka składające się z ~ 30 komórek) oraz następnie w węzle zarodkowym blastocysty (blastocysta składa się z ~ 250 komórek) [1]. PKM nie mogą odtworzyć łożyska, ale dają początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, mesodermy i endodermy) i mogą różnicować się w tzw. ukie-

runkowane tkankowo komórki macierzyste (UTKM). UTKM ze względu na ograniczoną już możliwość różnicowania tylko do jednego rodzaju tkanki, zwane też są komórkami macierzystymi monopotentnymi [2].

Obliczono, że podczas rozwoju embrionalnego z zapłodnionej zygoty (KMT), po około 47 podziałach, powstaje łącznie $\sim 10 \times 10^{15}$ komórek należących do dwustu różnych rodzajów komórek tworzących tkanki i organy ciała człowieka. Komórki macierzyste „pracują” ciężko przez całe życie osobnicze i w wyniku ich zsynchronizowanych procesów samoodnawiania i różnicowania rozwija się i funkcjonuje przez wiele lat dorosły, ciągle regenerujący się organizm. Wiadomo bowiem, że nabłonek jelitowy wymienia się co 48 godzin, naskórek co 14 dni, granulocyty co tydzień, a erytrocyty mają okres półtrwania 100–150 dni. W innych narządach i tkankach wymiana zużytych komórek jest wolniejsza, niemniej istnieją dzisiaj dowody, że nawet takie narządy jak serce czy mózg wykazują powolną odnowę biologiczną. Trudno sobie bowiem wyobrazić aby pojedyncza komórka w narządzie mogła żyć przez 80 lat.

Biorąc pod uwagę ogromny potencjał komórek macierzystych oraz uwzględniając jak ważną rolę odgrywają one w codziennej regeneracji szeregu tkanek (m.in. tkanki krwiotwórczej, naskórka czy nabłonek jelitowy) nie powinno dziwić, że komórki te stały się przedmiotem żywego zainteresowania klinicystów. Słusznie upatruje się w nich klucz do poprawienia jakości oraz przedłużenia życia ludzkiego.

Potencjalne źródła komórek macierzystych do regeneracji tkankowo/narządowej

Koncepcja wykorzystania komórek macierzystych w klinice pojawiła się najpierw w hematologii. Od około 40 lat wykorzystuje się bowiem krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM), które zgodnie z podaną powyżej definicją należą do przedziału UTKM dla krwiotworzenia, w leczeniu szeregu chorób układu krwiotwórczego [3, 4]. Coraz częściej stosuje się również UTKM naskórka w leczeniu oparzeń skóry, lub dla usprawnienia procesu gojenia się owrzodzeń troficznym kończyn [5]. Zaawansowana jest również technologia pozyskiwania fibroblastów szpiku kostnego – tzw. macierzystych komórek mezenchymalnych, które można uważać za UTKM dla tkanki łącznej, w leczeniu ubytków kostnych [6, 7]. Wspólną cechą komórek macierzystych krwiotwórczych, naskórka, czy mezenchymalnych jest stosunkowo duża łatwość ich pozyskiwania [3, 7]. Przeciwnie, ze zrozumiałych względów etycznych i technicznych, znacznie trudniej jest uzyskać od zdrowych dawców komórki macierzyste innych tkanek i narządów, jak np. mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby, wysepek trzustki lub ośrodkowego układu nerwowego, w ilościach pozwalających na ich potencjalne wykorzystanie terapeutyczne.

W związku z powyższym, w ostatnich latach pojawiły się koncepcje wykorzystania terapeutycznego bardziej prymitywnych PKM, które jak wspomniano powyżej mają zdolność różnicowania się we wszystkie komórki zarodka – będących tym samym źródłem UTKM [8, 9]. Wykorzystanie PKM w medycynie klinicznej wzbudziło na świecie spore nadzieje na rozwój nowych metod leczniczych, ale jednocześnie spowodowało szereg dyskusji i emocji natury religijno-etycznej [10, 11]. Problem wykorzy-

stania tych komórek jest różnie postrzegany przez różne religie, gdyż dotyczy problemu początku życia człowieka, który jest różnie interpretowany przez różne główne religie świata. Próbując otrzymać wczesno rozwojowe PKM zbliżamy się bowiem bardzo blisko do TKM, a więc do komórki macierzystej, która może rozwinąć się w dorosłego osobnika. W ten sposób nauka dotyka dogmatów twierdzących na jakim etapie embriogenezy zaczyna się życie.

Embrionalne i nieembrionalne źródła komórek macierzystych

PKM mogą być potencjalnie pozyskiwane z czterech różnych źródeł [8, 9], które wymieniono w Tabeli 1. Każde z tych potencjalnych źródeł ma swoje zalety jak i ograniczenia, które zostaną pokrótce przedstawione poniżej. Omówimy zarówno źródła PKM pochodzących z zarodków jak i otrzymywanych z dorosłych tkanek. W naszej opinii, takie szersze przedstawienie problemu może być pomocne w zrozumieniu zjawisk, o których często wypowiadają się osoby bez odpowiedniego poziomu wiedzy biologicznej, operujące błędnie konkretnymi pojęciami. W związku z tym nie chcemy uciekać od trudnych i drażliwych tematów, wierząc że naukowiec, lekarz, człowiek XXI wieku musi sam dokonać wyboru, zgodnie z własnym sumieniem oraz osobistym światopoglądem, co do potencjalnych granic wykorzystania różnych źródeł komórek macierzystych w medycynie.

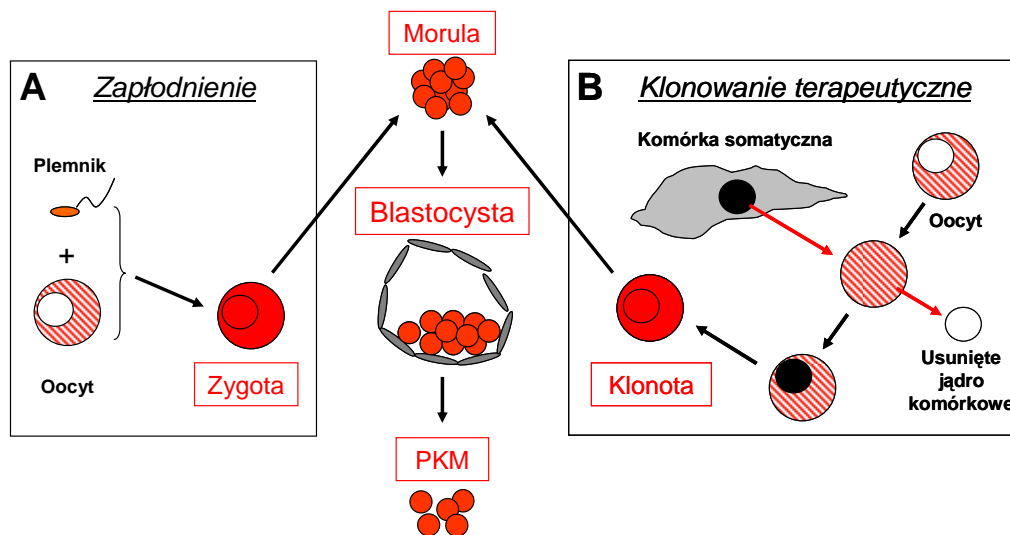
Tabela 1. Różne potencjalne źródła pluripotencjalnych komórek macierzystych (PKM)

	PKM Izolowane z bankowanych zarodków otrzymanych drogą zapłodnienia	PKM izolowane z zarod- ków otrzymanych poprzez utworzenie klonoty (klonowanie terapeutyczne)	PKM izolowane z dorosłych tkanek	PKM Uzyskane w wyniku transformacji komórek somatycznych (indukowane PKM)
Ryzyko powstania potworniaków	+	+	-/?	+
Problem niezgodno- ści tkankowej	+	-	-	-
Wymagany dawca komórki jajowej	+	+	-	-
Zastrzeżenia natury etycznej	tak	tak/nie*	nie	nie

* Problem różnie postrzegany przez różne główne religie światowe. Szereg religii potencjalnie akceptuje klonowanie terapeutyczne (np. większość protestantów, judaizm, islam i buddyzm) ale zdecydowana większość z nich odrzuca jednocześnie klonowanie reprodukcyjne.

– Pluripotencjalne komórki macierzyste izolowane z zarodków (komórki macierzyste embrionalne).

Wiadomo, że tkanki zarodkowe są potencjalnym źródłem PKM. Komórki takie można pozyskać z rozwijającego się zarodka w stadium moruli lub blastocysty (Rycina 1), wykorzystując np. zamrożone wczesne „nadliczbowe” morule, przechowywane



Ryc. 1. PKM pozyskiwane z zarodków. Panel A – PKM obdarzone właściwościami różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych pozyskuje się poprzez ekspansję PKM izolowanych z węgla zarodkowego blastocysty. Blastocystę można pozyskać poddając wzrostowi *in vitro* morule rozwijającą się z zygoty otrzymanej drogą zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik *in vitro*. Panel B – PKM można również pozyskać na drodze tzw. klonowania terapeutycznego podczas którego zamiast zapłodnienia wprowadza się jądro dojrzałej komórki somatycznej (np. fibroblastu) do cytoplazmy komórki jajowej, z której uprzednio usunięto jej własne jądro komórkowe. W wyniku tego procesu, zwanego jako „przeniesienie jądra” (ang. *nuclear transfer*) powstaje klonota, która podobnie jak zygota może dać początek blastocysty. Warto nadmienić, że zarówno zygota jak i klonota jeśli ulegną implantacji w macicy utworzą dojrzałego osobnika. Jeśli osobnik taki powstaje z klonoty mówimy o tzw. klonowaniu reprodukcyjnym. Zastosowanie tego typu strategii w wypadku człowieka budzi szereg zastrzeżeń natury etycznej. Jednak jak do tej pory nie udało się jeszcze otrzymać ludzkiej klonoty.

w klinikach gdzie wykonuje się zapłodnienia *in vitro*. Wykorzystując takie zarodki uzyskano pierwsze ustalone ludzkie linie komórek embrjonalnych [9, 12]. Wykorzystanie tych linii jest regulowane w poszczególnych krajach Europy, czy Ameryki Płn. zgodnie z prawem obowiązującym w danym państwie. Przykładowo w USA, zgodnie z dekretem prezydenta Georga Busha, jeśli były one otrzymane przed 9 sierpnia 2001 roku mogły być legalnie wykorzystane do badań finansowanych z funduszy federalnych. Jeśli otrzymane były ‘minutę’ po północy z 9 na 10 sierpnia 2001 roku takie prawo już się nie stosowało. Była to oczywiście sztucznie ustalona granica, która nie rozwiązywała drażliwego problemu zastosowania komórek macierzystych embrjonal-

nych w celach naukowych i terapeutycznych. Szybko jednak okazało się, że wiele z około 60 ludzkich linii, na których zezwolono prowadzenie badań, jest mało przydatnych. Linie te bowiem szybko zmieniały właściwości w hodowlach *in vitro*, co spowolniło, a często zatrzymało prowadzone badania.

PKM izolowane z zarodków do potencjalnych terapii budzą jednak również sporo zastrzeżeń natury naukowej. Zarodki takie jak wiadomo są tkankowo odmienne od potencjalnego biorcy komórek. W związku z powyższym ustalone linie komórek embrionalnych będą różnicowały się w komórki, które będą posiadały inny zestaw antygenów układu zgodności tkankowej niż potencjalny biorca. Uzyskane, potencjalne komórki do wykorzystania w terapii, będą więc rozpoznawane przez układ immunologiczny biorecy jako całkowicie obce, gdyż komórki pochodziły z zarodka niezgodnego w układzie HLA [13]. Ponadto trudno sobie wyobrazić, biorąc pod uwagę względy etyczne jak i techniczne (dostęp do komórek rozrodczych rodziców), że otrzymywałoby się takie zarodki dla konkretnego pacjenta „na zamówienie” od biologicznych rodziców. Badania u zwierząt doświadczalnych wykazały ponadto, że podanie komórek ustalonych lini embrionalnych powoduje powstawanie potworniaków u biorców [14, 15]. Nierealne wydaje się również pozyskiwanie pojedynczych blastomerów izolowanych drogą mikrobiopsji wczesnej moruli, jak to zostało ostatnio zaproponowane przez jeden z zespołów badawczych. Dlatego też pozyskiwanie PKM dla celów klinicznych z normalnych ludzkich zarodków zostało słusznie zarzucone. Pozostał niemniej jednak trudny dylemat co zrobić z zamrożonymi w bankach na świecie zarodkami – trzymać je w nieskończoność w stanie hibernacji, rozmrozić i zniszczyć, czy też zastosować dla celów badań podstawowych.

– *Pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskiwane w wyniku klonowania terapeutycznego.*

Biorąc pod uwagę aspekty natury etycznej, problemy techniczne w pozyskiwaniu normalnych ludzkich zarodków oraz fakt, że PKM otrzymywane z takich zarodków będą różnicowały się w niezgodne tkankowo z biorcą tkanki, opracowano strategię izolowania PKM z wczesnych zarodków tworzonych w laboratorium w wyniku tzw. klonowania terapeutycznego (Tabela 1).

Strategia klonowania terapeutycznego polega na utworzeniu *in vitro* komórki, która jest równa pod względem potencjału rozwojowego zygocie [16, 17]. Komórka taka zwana jest klonotom (Rycina 1). Podczas tworzenia klonoty wykorzystuje się „jako inkubator biochemiczny” cytoplazmę komórki jajowej, z której uprzednio usuwa się jądro posiadające połowę (haploidalną liczbę) chromosomów. Do pozbawionej jądra komórki jajowej wprowadza się następnie jądro dojrzałej komórki somatycznej (np. jądro fibroblastu lub limfocyty), która posiada pełen garnitur chromosomalny. Proces ten różni się od zapłodnienia tym, że w przeciwieństwie do zapłodnienia nie występuje tutaj połączenie haploidalnej liczby chromosomów matki i haploidalnej liczby chromosomów ojca w unikalny diploidalny zestaw genów. W przeciwieństwie, wszystkie chromosomy (zestaw diploidalny), w tym niosące geny zgodności tkankowej, pochodzą z komórki somatycznej będącej dawcą jądra komórkowego [18].

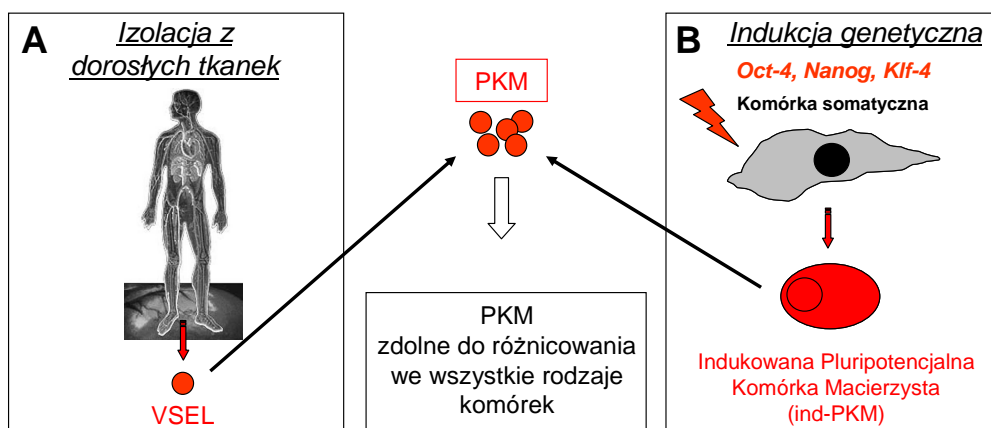
Po przeniesieniu jądra somatycznego do cytoplazmy komórki jajowej, wprowadzone chromosomy ulegają „odróżnicowaniu”. Jak wspomniano, cytoplazma komórki jajowej stanowi unikalny inkubator biochemiczny zawierający szereg enzymów mogących modyfikować DNA. Ogólnie ujmując, zjawisko to opiera się na procesach demetylacji DNA oraz odpowiedniej rearanzacji i ustaleniu specyficznego wzoru metylacji oraz acetylacji białek histonowych. Wszystko to prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny i powrotu zróżnicowanego już rozwojowo DNA komórki somatycznej dawcy do stanu jaki miało ono w zapłodnionej komórce jajowej. Takie zmiany w strukturze chromatyny umożliwiają ekspresję wczesnych rozwojowo genów.

Powstaje tym samym klonota będąca sztucznie stworzonym rodzajem KMT, która w odróżnieniu od zygoty posiada zestaw chromosomów – tym samym geny kodujące układ zgodności tkankowej, identyczny z komórką od której pochodziło jądro. Strategia ta, znana jako przeniesienie jądra komórkowego do komórki jajowej (ang. nuclear transfer), jest ciągle jeszcze jednak w stadium eksperymentalnym w modelach zwierzęcych u ssaków. Jak wiadomo, ostatni głośny skandal w Korei wykazał, że wbrew wcześniejszym doniesieniom nie udało się do tej pory nikomu jeszcze otrzymać ludzkiej klonoty.

Należy nadmienić że szereg emocji natury etycznej budzi potencjał rozwojowy klonoty [19]. Jak wspomniano, klonota podobnie jak zapłodniona komórka jajowa jest komórką totipotencjalną. W hodowlach *in vitro* może dać początek moruli i blastuli, z których można pozyskać PKM, podobnie jak to próbowano czynić z zarodków rozwijających się w wyniku fizjologicznego zapłodnienia. Strategia pozyskiwania takich komórek z zarodków tworzonych przez klonotę, znana jest pod nazwą tzw. klonowania terapeutycznego. Z drugiej jednak strony jeżeli klonotę umieści się w macicy, może ona podobnie jak zygota dać początek nowemu osobnikowi. Powoduje to duże opory natury etycznej, gdyż stwarza podstawy tzw. klonowania reprodukcyjnego [20]. W ten sposób otrzymano np. słynną owcę Dolly. Możliwość klonowania terapeutycznego, jako droga pozyskania komórek terapeutycznych zgodnych tkankowo z dawcą jądra komórkowego, jest natomiast dopuszczana przez niektóre kręgi religijno-kulturowe. Jak jednak wspomniano nie udało się do tej pory uzyskać ludzkiej klonoty oraz pochodzących z niej ludzkich PKM [21].

Teoretyczna możliwość uzyskania ludzkich PKM na drodze klonowania terapeutycznego spowodowała ostrą krytykę ze strony niektórych kręgów kulturowo-religijnych. Postawiono bowiem zarzut, że zarodek otrzymany z klonoty powinien być traktowany jako istota żywa, pełnowartościowy człowiek. W odpowiedzi na te obawy środowisko naukowe zaproponowało szereg modyfikacji pozyskiwania PKM z zarodków. Zgodnie z powyższym, PKM zaczęto pozyskiwać z zarodków uzyskanych w wyniku partenogenezy (omijając proces fizjologicznego zapłodnienia), drogą mikrobiopsji rozwijającej się moruli uzyskując pojedyncze blastomery będące materiałem wyjściowym do namnażania PKM, lub też tworząc niezdolne rozwojowo zarodki poprzez wprowadzenie tzw. „genu samobójczego” który uniemożliwia ukończenie pełnej embriogenezy [22].

Oprócz oporów natury etyczno-religijnej główną przeszkodą szerszego wykorzystania klonowania terapeutycznego okazała się i) dotychczasowa nieefektywność tej strategii w uzyskaniu ludzkich klonot, ii) potrzeba dostępu do ludzkich komórek jajowych (oocytów) oraz iii) obserwacje, że PKM otrzymane z zwierzęcych klonot, podobnie jak komórki embrionalne, tworzą u zwierząt doświadczalnych potworniaki. Co jednak najważniejsze, w międzyczasie pojawiły się inne, alternatywne metody pozyskiwania PKM z dorosłych tkanek np. poprzez modyfikacje genetyczną komórek izolowanych od pacjentów (Rycina 2), które stały się prawdziwą alternatywą dla embrionalnych komórek macierzystych. Strategie pozyskiwania PKM z takich alternatywnych źródeł omówione zostaną poniżej.



Ryc. 2. PKM pozyskiwane ze źródeł pozazardokowych. Panel A – PKM mogą również być izolowane z tkanek dojrzałych osobników. Takimi komórkami są np. VSELS, wykazujące szereg cech komórek embrionalnych. Jak wykazano są one zdeponowane w rozwijających się podczas embriogenezy narządach i znajdują się w stanie „uśpienia”. Obecnie prowadzone są intensywne prace nad wybudzeniem tych komórek, tak aby je w pełni wykorzystać w medycynie regeneracyjnej. **Panel B** – PKM można również pozyskać transformując komórki somatyczne izolowane z tkanek dorosłych osobników (np. fibroblasty) za pomocą genów kodujących embrionalne czynniki transkrypcyjne (np. Oct-4, Nanog, Klf-4). Powstające w wyniku transformacji tzw. ind-PKM posiadają wiele cech podobnych do PKM pozyskiwanych drogą klonowania terapeutycznego m.in. zgodny z dawcą komórki układ antygenów zgodności tkankowej. Warto nadmienić, że udało się uzyskać już ind-PKM z komórek człowieka.

– *Komórki macierzyste pozyskiwane z dorosłych tkanek.*

Niejąko równolegle z pierwszymi doniesieniami o możliwości pozyskiwania ludzkich linii komórek embrionalnych z zarodków, zaczęto intensywnie poszukiwać innych alternatywnych źródeł PKM [9]. Pozyskanie takich alternatywnych komórek było szczególnie oczekiwane z zainteresowaniem przez oponentów stosowania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Nie będzie przesadą stwierdzenie, że „oczekiwano” pojawienia się takich potencjalnych źródeł komórek dla celów terapeutycznych. Dlatego też kilka lat temu zaproponowano teorię tzw. „plastyczności komórek macierzystych” lub ich zdolności do „transróżnicowania”. Zgodnie z tą teorią,

UTKM, czyli np. KKM, które mogą być łatwo izolowane ze szpiku kostnego, byłyby zdolne do odróżnicowania się w komórki macierzyste swoiste dla innych narządów np. mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego lub wątroby [23, 24]. Ogromne nadzieje pokładano więc w potencjalnym zastosowaniu KKM izolowanych ze szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, w terapiach regeneracyjnych uszkodzonych narządów i tkanek. Szereg artykułów naukowych, opublikowanych w najlepszych pismach naukowych, sugerowało teorię plastyczności KKM demonstrując pozytywne wyniki wykorzystania tych komórek w zwierzęcych modelach regeneracyjnych w zawale serca [25], udarze mózgu [26], mechanicznym uszkodzeniu rdzenia kręgowego [27] oraz toksycznym uszkodzeniu wątroby [28].

Pomimo przytoczonych powyżej obiecujących wyników rola szpiku kostnego oraz zawartych w nim KKM w regeneracji uszkodzonych narządów, budziła jednak od początku kontrowersje [29, 30]. Seria badań z zastosowaniem fenotypowo zdefiniowanych i oczyszczonych subpopulacji macierzystych komórek hematopoetycznych, przyniosła bowiem rozczarowanie ukazując negatywne wyniki w modelach regeneracji mięśnia sercowego [31] oraz mózgu [32]. Te nieoczekiwane obserwacje podważyły koncepcje plastyczności KKM. Część uzyskanych poprzednio pozytywnych wyników zaczęto tłumaczyć poprzez fenomen fuzji komórkowej [33]. Według tej teorii, przeszczepiane KKM mogłyby ulegać fuzji (stopieniu) z komórkami uszkodzonych narządów. Tak więc komórki w uszkodzonych narządach, leczonych przeszczepionymi KKM, były heterokarionami powstałymi na skutek fuzji przeszczepionych KKM oraz komórek należących do uszkodzonego narządu. Warto nadmienić jednak, że fuzja komórkowa należy do bardzo rzadkich, przypadkowych zjawisk i nie może w pełni tłumaczyć opublikowanych, pozytywnych wyników badań wskazujących udział komórek izolowanych z dorosłych tkanek w regeneracji.

Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość modyfikacji fenotypu komórek znajdujących się w tkankach poprzez przeniesienie receptorów komórkowych, białek cytoplazmatycznych oraz mRNA z sąsiednich komórek, za pomocą wymiany mikrofragmentów komórkowych (ang. microvesicles) [34, 35]. Mikrofragmenty komórkowe są kulistymi strukturami, w których fragment cytoplazmy komórkowej jest otoczony błoną komórkową [35, 36]. Złączanie mikrofragmentów z powierzchni błony komórkowej opisane zostało jako zjawisko fizjologiczne, towarzyszące wzrostowi komórek oraz ich aktywacji w procesach takich jak np.: niedotlenienie tkanek, czy ich uszkodzenie [35, 36]. W związku z tym, wspomniane przeniesienie receptorów powierzchniowych, białek oraz informacji genetycznej, jaką jest mRNA, pomiędzy wszczepionymi KKM szpiku kostnego, a komórkami gospodarza za pomocą mikrofragmentów błonowych, mogłoby przejściowo prowadzić do zmiany fenotypu komórek uszkodzonego organu.

Istnieje jednak jeszcze inne, wydaje się najbardziej logiczne wytłumaczenie wyjaśniające pozytywne wyniki wykazujące „plastyczność” KKM oraz udział komórek szpikowych w regenerację uszkodzonych narządów. Od samego początku entuzjastycznych badań nad plastycznością komórek nie wzięto poważnie pod uwagę możliwości, że szpik kostny zawiera heterogenną populację komórek macierzystych, obejmującą

mującą obok KKM komórki macierzyste niekrwiorwórcze, a więc specyficzne dla innych tkanek [37, 38]. W świetle dzisiejszego stanu wiedzy, widać wyraźnie, że zignorowanie takiej możliwości oraz brak odpowiednich kontroli w prowadzonych badaniach nad regeneracją tkanek niehematopoetycznych z udziałem przeszczepionych komórek szpiku kostnego oraz krwi pępowinowej, doprowadziło do wielu nieścisłości i niewłaściwych interpretacji omawianych zjawisk. Dziś już wiadomo, że szpik kostny zawiera szereg różnych populacji komórek macierzystych niehematopoetycznych, zidentyfikowanych niezależnie przez różne grupy naukowców. Zgodnie z powyższym, najlepszym wyjaśnieniem zjawiska plastyczności KKM wydaje się fakt obecności heterogennej populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, których to udział w regeneracji uszkodzonych tkanek może tłumaczyć opisywane zjawiska „plastyczności i transróżnicowania” KKM. Tak więc, fakt występowania wczesnych rozwojowo niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym, krwi obwodowej lub pępowinowej może wyjaśnić bardziej wiarygodnie niż transróżnicowanie KKM pozytywne wyniki „plastyczności” [37, 38].

Pierwsze poszukiwania takich komórek – komórek macierzystych niehematopoetycznych – rozpoczęto w szpiku kostnym, krwi pępowinowej i mobilizowanej krwi obwodowej. Planem poszukiwań, które podjęła nasza grupa badawcza, było zidentyfikowanie populacji tzw. małych embrionalno-podobnych komórek macierzystych (ang. *very small embryonic-like stem cells* – VSELs). W trakcie tych badań wykazano, że komórki te są zdeponowane w tkankach podczas rozwoju embrionalnego, jako populacja PKM, stanowiąca źródło bardziej zróżnicowanych UTKM. Stanowią one jednak bardzo rzadką populację komórek np. w dorosłym szpiku kostnym ok. 1 komórka VSEL przypada na 10^4 – 10^5 komórek jednojądrowych [39, 40]. Wykazano również, że szpik kostny, jak inne tkanki młodych osobników, zawierają więcej komórek o fenotypie VSELs i liczba tych komórek maleje z wiekiem [39, 41]. Wiadomo, że komórki te pojawiają się w krwi obwodowej w stanach uszkodzeń narządowych, uwidaczniając niejako naturalny mechanizm organizmu polegający na mobilizacji tych komórek aby brały udział w próbie regeneracji uszkodzonych tkanek [42, 43]. Dane naszego zespołu wskazują, że VSELs rezydujące w szpiku kostnym, odpowiadają tzw. długoterminowo odnawiającym hematopoezę komórkom macierzystym (ang. *long term repopulating hematopoietic stem cells*) [44]. Myśląc o wykorzystaniu tych komórek do potencjalnych celów terapeutycznych, niezbędnym staje się szybkie opracowanie skutecznej metody ekspansji tych komórek *ex vivo*.

– Indukowane PKM

Kolejnym rodzajem PKM, które zaproponowano ostatnio jako komórki macierzyste alterantywe dla komórek izolowanych z zarodków, są tzw. indukowane PKM (ind-PKM) (Rycina 2). Komórki te są uzyskiwane w wyniku transformacji dorosłych komórek somatycznych (hodowanych *in vitro*) za pomocą genów kodujących czynniki transkrypcyjne kluczowe dla rozwoju komórek embrionalnych (Oct-4, Nanog, Klf4) [45, 46]. Geny te wprowadzane są do komórki somatycznej (np. komórki fibroblastu) za

pomocą wektorów retrowirusowych. W wyniku powyższej strategii można uzyskać transformowaną komórkę, która posiada szereg właściwości PKM (m.in. różnicuje się w komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych).

Efektywność wspomnianej modyfikacji jest jednak stosunkowo niska. Średnio jedna komórka na kilka tysięcy komórek poddanych powyższej manipulacji genetycznej, ulega transformacji (indukcji do stanu embrionalnego) i zaczyna proliferować tworząc klon składający się z ind-PKM. Jest to jednak trudno kontrolowany proces, a komórki uzyskane w wyniku powyższej strategii, podobnie jak komórki embrionalne izolowane z zarodków, tworzą potworniki w modelach doświadczalnych u zwierząt laboratoryjnych. Wprowadzanie do komórek somatycznych genów indukujących powstanie ind-PKM zaburza ponadto strukturę i organizację DNA, co może potencjalnie prowadzić do indukowania mutacji i powstania komórek nowotworowych.

Obecnie próbuje się uzyskać ind-PKM ograniczając liczbę wprowadzonych genów (np. transformując komórki tylko za pomocą pojedynczego genu Oct-4) oraz próbując zastąpić wprowadzane geny pewnymi niskocząsteczkowymi molekułami, które bezpośrednio mogą „odróżnicowywać” DNA w komórkach somatycznych [47, 48]. Wydaje się że jest to bardziej obiecująca strategia pozyskiwania ind-PKM w porównaniu z transformacją komórek za pomocą wprowadzanych genów w niekontrolowany sposób do chromosomów.

Obecnie przyjmuje się, że ind-PKM są alternatywą komórek pozyskiwanych z zarodków m.in. również tych otrzymywanych na drodze klonowania terapeutycznego. Tak więc, kontrowersyjny problem wykorzystania komórek z zarodków niejako rozwiązuje się na naszych oczach dzięki ind-PKM. Otrzymanie ind-PKM nie wymaga dostępu do ludzkich komórek jajowych, a co najważniejsze komórki powstające z ind-PKM, podobnie jak te otrzymywane drogą klonowania terapeutycznego, posiadają te same geny kodujące układ zgodności tkankowej jak potencjalny biorca. Mogłyby być wykorzystane w klinice bez ryzyka odrzucenia powstających z nich tkanek. Co najważniejsze, o ile strategia klonowania terapeutycznego nie powiodła się jak do tej pory w przypadku komórek człowieka, otrzymano już szereg ludzkich linii komórek ind-PKM. Należy jednak pamiętać że, ind-PKM powodują powstawanie potworników w modelach zwierzęcych oraz wciąż potrzebne jest skonstruowanie optymalnego, bezwirusowego modelu transformacji. Problem, ten musi zostać rozwiązany zanim zastosuje się takie komórki w klinice.

Dotychczasowe próby wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej – nadzieje w wykorzystaniu komórek VSELs.

Dotychczas podjęto już pierwsze próby kliniczne z wykorzystaniem komórek macierzystych w regeneracji narządów. W tym celu próbowano wykorzystać izolowane ze szpiku komórki jednojądrowe lub UTKM tkanki łącznej (*ang. mesenchymal stem cells*). Jednym z potencjalnych, pozytywnych efektów terapeutycznych w próbach regeneracji tkanek i narządów z zastosowaniem komórek mesenchymalnych lub jednojądrowych szpiku kostnego, może być efekt parakryny przeszczepionych komórek. Komórki mesenchymalne jak i komórki hematopoetyczne są bowiem źródłem wielu

czynników wzrostowych oraz cytokin mogących potencjalnie promować procesy regeneracyjne oraz waskularyzację, jeśli czynniki te zostaną wydzielone w miejscu uszkodzenia [49, 50].

Nie ulega wątpliwości, że do trwałej odbudowy struktury tkanek, należałoby zastosować jednak PKM. Dlatego ważne jest opracowanie odpowiednich protokołów różnicowania ind-PKM oraz namnażania *ex vivo* komórek VSELs.

Biorąc pod uwagę to ostatnie wyzwanie badawcze, stosując odpowiednie modele uszkodzeń narządów u zwierząt, poszukujemy odpowiedzi na pytanie czy VSELs znajdują faktycznie praktyczne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Pierwszym, potencjalnym ograniczeniem ich wykorzystania dla celów terapeutycznych jest stosunkowo niska liczba tych komórek w dorosłym szpiku kostnym (1 komórka VSEL na 10^4 – 10^5 komórek jednojądrowych szpiku kostnego). Co więcej, z naszych obserwacji wynika, że liczba VSELs jest wyższa u młodych osobników i maleje wraz z wiekiem [39, 41]. Istnieje również możliwość, że VSELs uwolnione ze szpiku po uszkodzeniu tkanek, nawet jeśli docierają bez przeszkód do uszkodzonego narządu, uczestniczą jedynie w regeneracji niewielkich uszkodzeń. Pojawia się tym samym uzasadniona obawa, że efektywna regeneracja większego uszkodzenia tkankowego (np. zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu, lub uszkodzonej wątroby) może przekraczać zdolności regeneracyjne tych stosunkowo rzadkich komórek. Dlatego tak ważne jest opracowanie protokołów służących do skutecznej ekspansji tych komórek. Po drugie, przemieszczenie VSELs do tkanek objętych uszkodzeniem, zależy od ukierunkowanych sygnałów chemotaktycznych, które mogą być niewystarczająco silne ze względu na obecność enzymów proteolitycznych, wydzielanych przez leukocyty krwi obwodowej i makrofagi tkankowe w miejscach uszkodzenia – które to degradują wydzielane przez uszkodzone tkanki chemoatraktanty dla VSELs. Przykładowo, metaloproteinazy trawiące białka macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielane przez komórki towarzyszące procesom zapalnym, odpowiadają m.in. za lokalną degradację czynnika chemotaktycznego pochodzenia stromalnego – ang. stromal derived factor-1 (SDF-1) w uszkodzonych narządach, co w efekcie upośledza migrację komórek macierzystych do miejsc uszkodzenia. W takiej sytuacji zmobilizowane VSELs mogą potencjalnie krążyć w krwi obwodowej, jako „bezdomna” populacja, a następnie wracać do szpiku kostnego lub zasiedlać inne organy. Po trzecie, aby VSELs mogły w pełni wykazać swój potencjał regeneracyjny, muszą być również w pełni funkcjonalne. Nie można wykluczyć możliwości, że VSELs rezydujące w szpiku kostnym, są funkcjonalnie „zablokowane”, pozostając w stadium swoistego „uśpienia”, wymagając odpowiednich sygnałów aktywacyjnych, których na razie jeszcze nie znamy.

Wyniki otrzymane w naszym laboratorium wskazują jednak, że VSELs mogą stanowić realną alternatywę dla komórek pozyskiwanych np. drogą tzw. klonowania terapeutycznego, czy ind-PKM. W czasie kiedy trwa etyczno-religijna debata nad zastosowaniem komórek embrionalnych w klinice, istnieje uzasadniona potrzeba zbadania potencjału terapeutycznego VSELs, jako alternatywnego źródła komórek do terapii. Musimy więc jak najszybciej znaleźć odpowiedź na pytanie, czy izolowane z tkanek

dorosłych osobników VSELs, mogą być efektywnie zastosowane w klinice. Nadchodzące lata z pewnością przyniosą ważne odpowiedzi na postawione pytania.

PIŚMIENNICTWO

1. O'Farrell PH, Stumpff J, Su TT. Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? *Curr Biol* 2004; **14**: R35-45.
2. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; **309**: 255-6.
3. Lo Celso C, Scadden D. Isolation and transplantation of hematopoietic stem cells (HSCs). *J Vis Exp* 2007: 157.
4. Karanes C, Nelson GO, Chitphakdithai P, et al. Twenty years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for adult recipients facilitated by the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**: 8-15.
5. Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007; **15** Suppl 1: S18-26.
6. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; **25**: 2739-49.
7. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; **276**: 71-4.
8. Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2008; **4**: 3-11.
9. Stocum DL, Zupanc GK. Stretching the limits: stem cells in regeneration science. *Dev Dyn* 2008; **237**: 3648-71.
10. Lo B, Kriegstein A, Grady D. Clinical trials in stem cell transplantation: guidelines for scientific and ethical review. *Clin Trials* 2008; **5**: 517-22.
11. Lo B, Zettler P, Cedars MI, et al. A new era in the ethics of human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 2005; **23**: 1454-1459.
12. Zhu WZ, Hauch KD, Xu C, Laflamme MA. Human embryonic stem cells and cardiac repair. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; **23**: 53-68.
13. Cabrera CM, Cobo F, Nieto A, Concha A. Strategies for preventing immunologic rejection of transplanted human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 2006; **8**: 517-8.
14. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* 2008; **100**: 133-158.
15. Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 1526-1530.
16. Hwang WS, Lee BC, Lee CK, Kang SK. Cloned human embryonic stem cells for tissue repair and transplantation. *Stem Cell Rev* 2005; **1**: 99-109.
17. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; **39**: 295-302.
18. Markoulaki S, Meissner A, Jaenisch R. Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Methods* 2008; **45**: 101-114.
19. McHugh PR. Zygote and "clonote"--the ethical use of embryonic stem cells. *N Engl J Med* 2004; **351**: 209-11.
20. Green RM. Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines? *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 480-5.
21. Tsunoda Y, Kato Y. Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation* 2002; **69**: 158-61.

22. Brevini TA, Gandolfi F. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2008; **41** Suppl 1: 20-30.
23. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; **290**: 1779-82.
24. Quesenberry PJ, Abedi M, Aliotta J, et al. Stem cell plasticity: an overview. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **32**: 1-4.
25. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701-705.
26. Hess DC, Abe T, Hill WD, et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 2004; **186**: 134-144.
27. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, et al. Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia. *J Neurosci Res* 2002; **70**: 721-733.
28. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168-1170.
29. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; **3**: 323-328.
30. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; **297**: 2256-2259.
31. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**: 664-668.
32. Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 2002; **297**: 1299.
33. Lucas JJ, Terada N. Cell fusion and plasticity. *Cytotechnology* 2003; **41**: 103-109.
34. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; **98**: 3143-3149.
35. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; **20**: 1487-95.
36. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; **11**: 156-64.
37. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question. *Exp Hematol* 2005; **33**: 613-23.
38. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**: 29-40.
39. Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857-869.
40. Zuba-Surma EK, Kucia M, Abdel-Latif A, et al. Morphological characterization of Very Small Embryonic-Like stem cells (VSELs) by ImageStream system analysis. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 292-303.
41. Zuba-Surma EK, Wu W, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Very small embryonic-like stem cells in adult tissues-Potential implications for aging. *Mech Ageing Dev* 2008; Feb 14.
42. Kucia M, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that Very Small Embryonic Like (VSEL) Stem Cells are Mobilized into Peripheral Blood. *Stem Cells* 2008; **26**: 2083-2092.
43. Zuba-Surma EK, Kucia M, Dawn B, Guo Y, Ratajczak MZ, Bolli R. Bone marrow-derived pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) are mobilized after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44**: 865-873.
44. Wysoczynski M, Kucia M, Zuba-Surma E, Wu W, Ratajczak M, Ratajczak J. An *in vivo* evidence that the CD45(negative) adult marrow-derived CXCR4(+) SSEA-4(+) OCT-4(+) very small embryonic-

- like (VSEL) stem, cells may differentiate into CD45(positive) long term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 2007; **110**: 155A.
45. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; **448**: 318-24.
 46. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-76.
 47. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; **136**: 411-9.
 48. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; **322**: 949-53.
 49. Huang NF, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regen Med* 2008; **3**: 877-92.
 50. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; **98**: 1076-84.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.04.2009 r. i została zakwalifikowana do druku 30.04.2009 r.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. med. Mariusz Z. Ratajczak
Kierownik Zakładu Fizjologii
Katedra Fizjopatologii PAM
ul. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin
email: mzrata01@louisville.edu