

Received: 2003.11.18

Accepted: 2004.01.26

Published: 2004.04.05

Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne

Stem cells – biology and therapeutic application

Magdalena A. Sikora, Waldemar L. Olszewski

Zakład Chirurgii Transplantacyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

Streszczenie

Z komórkami macierzystymi łączy się ogromne nadzieje dotyczące terapii komórkowych. Jest to obecnie jeden z najbardziej dynamicznie rozwijających się obszarów wiedzy. Komórka macierzysta ma nieograniczoną potencję do samoodnowy. Postrzegana jest jako źródło otrzymywania *in vitro* w pełni zróżnicowanych komórek potomnych zdolnych do naprawy uszkodzonych tkanek. W pracy zawarto informacje z zakresu biologii ludzkich embrionalnych komórek macierzystych: ES (embrional stem cells), EG (embrional germ cells), EC (embrional carcinoma cells). Opisano również możliwości wykorzystania ludzkich embrionalnych komórek macierzystych z uwzględnieniem otrzymywania swoistej linii komórkowej i sygnałów zaangażowanych w ich kierunkowe różnicowanie. Natomiast informacje dotyczące dojrzałych komórek macierzystych odnoszą się do komórek hematopoetycznych oraz komórek rezydujących w wybranych tkankach i narządach: śródbłonku, trzustce, wątrobie, naskórku, i w przewodzie żołądkowo-jelitowym. Opisano sposoby ich identyfikacji według markerów powierzchniowych, możliwości transdyferencjacji *in vitro*, zjawisko plastyczności *in vivo* oraz cechy morfologiczne i genetyczne. Poruszono również zagadnienia dotyczące terapii komórkowych w leczeniu cukrzycy.

Słowa kluczowe:

komórki macierzyste • dojrzałe komórki macierzyste • embrionalne komórki macierzyste • plastyczność komórek macierzystych • transdyferencjacja • terapia komórkowa

Summary

Enormous hope is connected with stem cells with regard to cell therapy, and this has become one of the most dynamically developing areas of science at the moment. A stem cell has unlimited potential for self-renewal. It appears that it can be a source of *in vitro* differentiated progeny cells capable of repairing damaged tissue. This review provides information about the biological properties of embryonic stem cells, i.e. ESs (embryonic stem cells), EGs (embryonic germ cells), and ECs (embryonic carcinoma cells). Possible human embryonic stem cell applications are described, with consideration of the desired cell line and the signals involved in their differentiation. The information about adult stem cells present – hemopoietic stem cells and the cells residing in selected tissues and organs: endothelium, pancreas, liver, epithelium, and gastrointestinal tract. Methods of their identification using the cell surfaces are also presented: the possibilities of *in vitro* transdifferentiation, the phenomenon of *in vivo* plasticity, as well as morphological and genetic properties. Some topics of cell therapy and its clinical application in diabetes amplification are included.

Key words:

stem cells • adult stem cells • embryonal stem cells • plasticity of stem cell • transdifferentiation • cell therapy



Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5348.pdf

Word count: 3222

Tables: –

Figures: –

References: 68

Adres autorów: Zakład Chirurgii Transplantacyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, e-mail: madzia@cmdik.pan.pl

KOMÓRKI MACIERZYSTE

Komórka macierzysta to komórka mająca zdolność do podziału – samoodnowy przez nieograniczony czas, często przez cały okres życia organizmu, natomiast pod wpływem działania odpowiednich bodźców może się zróżnicować w wiele typów komórek budujących organizm. Komórka macierzysta jest multipotentna, gdy może wyspecjalizować się w więcej niż jeden typ komórek potomnych, pluripotentna, gdy różnicuje się we wszystkie typy dojrzałych komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych [3, 12] lub totipotentna, zdolna do utworzenia całego organizmu i łożyska [17]. Totipotentnymi komórkami macierzystymi są blastomery wchodzące w skład dzielącej się zygoty [17]. Dobrym przykładem komórek pluripotentnych są embrionalne komórki macierzyste pochodzące z najwcześniejszego stadium rozwoju zarodka – blastocysty – mogą się różnicować we wszystkie trzy listki zarodkowe i pochodzące z nich komórki tkanek [10,45,46,48,51,55,57,60]. Dojrzałe komórki macierzyste występujące w tkankach organizmu są unipotentne. Oznacza to, że są zdolne do różnicowania w prawidłowych warunkach jedynie w obrębie jednej linii komórkowej. Dojrzałe komórki macierzyste znajdują się w tkankach w stanie niezróżnicowanym; mogą dawać pulę komórek wyspecjalizowanych jedynie w komórki tkanki, z której pochodzą. Brak dowodów na to, że dojrzałe komórki macierzyste są pluripotentne [3, 12]. Wszystkie komórki macierzyste wykazują ekspresję genu *Bcrp1*, którego produkt odpowiada za utrzymanie komórek w stanie niezróżnicowanym [66].

EMBRIONALNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Embrionalne komórki macierzyste (ES – embrional stem cells) pochodzą z epiblastu blastocysty i stanowią wewnętrzną masę komórek tego stadium rozwojowego zarodka. Są zdolne do nieskończonej liczby symetrycznych podziałów bez różnicowania się; wykazują długi okres samoodnowy. Proces różnicowania embrionalnych komórek macierzystych prowadzi do powstania trzech listków zarodkowych: endodermy, mezodermy i ektodermy [10,46,51,55,57]. Znana jest również ich zdolność do kolonizowania linii zarodkowej, z której w dojrzałym organizmie powstają oocyty i plemniki [56]. Kolejną ważną cechą komórek ES jest klonogenność, co oznacza, że pojedyncza komórka daje początek kolonii genetycznie identycznych komórek potomnych mających cechy matczyne. Komórki ES zawierają i utrzymują pełen diploidalny zestaw chromosomów, jednakże nie wykazują inaktywacji drugiego z chromosomów X. Udowodniono, że ekspresjonowany przez nie czynnik transkrypcyjny Oct-4 po-

przez aktywację lub inhibicję docelowych genów utrzymuje je w stanie podziału bez różnicowania. Komórki te wykazują ekspresję antygenu SSEA-1 oraz fosfatazy zasadowej [10,46,51,55,57,60].

POCHODZENIE EMBRIONALNYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH. RÓŻNICE POMIĘDZY KOMÓRKAMI EG I ES

Embrionalne komórki zarodkowe człowieka (EG – embrional germ cells) wywodzą się z pierwotnych komórek zarodkowych znajdujących się w części zarodka nazwanej grzebieniem gonadalnym. Populacja tych komórek tworzy się podczas kształtowania gastruli, kiedy komórki embrionalne pnia migrują do grzebieni i tam osiadają. W prawidłowych warunkach rozwijają się w dojrzałe gamety [54,56]. Wśród cech różniących komórki EG i ES należy wymienić:

- inne pochodzenie obu typów komórek macierzystych: epiblast blastocysty (ES) i grzebień gonadalny (EG),
- stopień ich zróżnicowania. Uważa się, że embrionalne komórki zarodkowe w chwili osiedlenia w grzebieniu gonadalnym wykazują pewien stopień zróżnicowania w kierunku powstawania dojrzałych gamet. W hodowli laboratoryjnej utrzymywane są w stanie niezróżnicowanym jedynie do 70–80 podziału, natomiast embrionalne komórki macierzyste przez dwa lata. Udowodniono również, że komórki te można utrzymywać w hodowli przez czas nieograniczony [56],
- tworzenie potworników po podskórnym podaniu komórki myszy, które jest charakterystyczne tylko dla komórek ES (istnieją prace dowodzące o tworzeniu potworników również przez komórki EG) [22],
- warunki hodowli oraz czynniki utrzymujące komórki bez ich różnicowania,
- wygląd utworzonych hodowli: płaskie i luźne agregaty komórek ES i okrągłe wielowarstwowe konglomeraty komórek EG [55,56].

KOMÓRKI EC (EMBRIONAL CARCINOMA CELLS)

Komórki EC są trzecim typem pluripotentnych, embrionalnych komórek macierzystych. Wywodzą się z grzebieni gonadalnych, a ich cechami charakterystycznymi są: heteroploidalność, duża aktywność czynnika transkrypcyjnego Oct-4 i telomerazy. Komórki EC są odpowiedzialne za powstawanie teratokarcinomy – nowotworu składającego się z różnorodnych tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych. Odnaleziono w nich komórki m.in.: chrząstki, kości, nabłonka płaskiego, neuroektodermy, mięśni itp. Komórki EC wyizolowane z nowotworu są hodowane na podłożach zawierających surowicę z dodatkiem lub bez warstwy odżywczej [21].

POTENCJALNE WYKORZYSTANIE LUDZKICH EMBRYONALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Opracowanie metody kontrolowania procesu różnicowania embrionalnych komórek macierzystych w ściśle określonej linii komórkowej stało się obecnie głównym przedmiotem zainteresowania badaczy. Stworzone *in vitro* linie komórkowe mogłyby posłużyć w przyszłości jako narzędzia do naprawy uszkodzonej w wyniku choroby tkanki. Przeprowadzane są liczne próby przeszczepiania tkanek wywodzących się z komórek macierzystych w następujących chorobach: choroba Parkinsona, cukrzyca typu I, uszkodzenia rdzenia kręgowego, dystrofia mięśni Dauchenna, wady serca itp. [9, 28,29].

Metoda otrzymywania swoistej linii komórkowej z embrionalnych komórek macierzystych i wykorzystania jej do naprawy uszkodzonej tkanki składa się z następujących etapów:

- pobranie embrionalnych komórek macierzystych,
- otrzymanie czystej kultury jednego typu komórek,
- selekcja linii poprzez sortowanie komórek,
- indukcja różnicowania dzięki obecności odpowiedniego czynnika wzrostowego albo komórek indukujących,
- testowanie funkcji fizjologicznej *in vitro* otrzymanej tkanki,
- sprawdzenie wydajności i bezpieczeństwa przeszczepu na modelu szczurzym,
- ocena integracji do tkanki biocy przeszczepu,
- wykazanie braku powstawania nowotworu [5, 31,36,43].

Wiele uwagi podczas opracowania metody terapii komórkowych poświęca się zapobieganiu odrzucaniu przeszczepianych tkanek bez konieczności stosowania leków immunosupresyjnych. Do tego celu wykorzystuje się techniki inżynierii genetycznej: manipulację genami MHC (geny zgodności tkankowej), tworzenie chimer lub wymianę jąder komórkowych [36,43,48].

SYGNAŁY ZAANGAŻOWANE W KIERUNKOWE RÓZNICOWANIE EMBRYONALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Najczęściej wykorzystywana obecnie metoda otrzymywania swoistej linii komórkowej z komórek ES *in vitro* obejmuje tworzenie ciał embrioidalnych. Komórka macierzysta hodowana na podłożu bez powierzchni adherentnej i warstwy odżywczej tworzy tzw. ciała embrioidalne, czyli konglomeraty złożone z szerokiej gamy zróżnicowanych komórek różnych typów. Należy podkreślić, że jest to proces spontaniczny, a skład wykształconego ciała jest dziełem przypadku [33,36,51,62]. W powyższy sposób otrzymano *in vitro*: kardiomiocyty [33] i trzustkowe komórki β [40]. Udowodniono również, że rozdzielone komórki ciała embrioidalnego hodowane w monokulturze z dodatkiem odpowiednich czynników wzrostowych tworzą całkowicie zróżnicowaną linię komórkową:

- kolagenaza typu IV zawarta w podłożu powoduje wykształcenie komórek nabłonkowych jelita, chrząstki, kości, mięśni gładkich i prążkowanych [57],
- czynnik wzrostu fibroblastów dodany do podłoża powoduje różnicowanie w komórki hematopoetyczne [33].

Zidentyfikowano również czynniki wzrostowe niewpływające na różnicowanie komórek ES w dojrzałą tkankę, lecz prowadzące do utworzenia listków zarodkowych:

- czynnik wzrostu nerwów NGF oraz czynnik wzrostu hepatocytów HGF powodują różnicowanie we wszystkie trzy listki zarodkowe,
- naskórkowy czynnik wzrostu EGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF oraz kwas retinowy i białko BMP-4 umożliwiają różnicowanie jedynie do ektodermy i mezodermy,
- czynnik martwicy nowotworów TGF- β 1 lub aktywina A wpływają na powstanie komórek mezodermalnych [53].

DOJRZAŁE KOMÓRKI MACIERZYTE

Dojrzałe komórki macierzyste charakteryzują dwie główne cechy: każda z nich wytwarza identyczną kopię siebie przez długi okres oraz wytwarza komórkę potomną, zróżnicowaną o charakterystycznych funkcjach i morfologii. Należy odróżnić komórkę macierzystą od komórki progenitorowej, która jest częściowo zróżnicowana i dzieli się, wytwarzając komórki potomne również zróżnicowane [3, 25,42]. Dojrzałe komórki macierzyste odnaleziono między innymi w szpiku kostnym, krwi obwodowej, rogówce, siatkówce, miazdze zębowej, wątrobie, skórze, trzustce i przewodzie jelitowym. Komórki macierzyste w tkankach są rzadkie. W szpiku kostnym np. występują z częstością 1/15000–10/15000 [3, 38,49]. Wykazują natomiast plastyczność. Termin ten oznacza, że komórka macierzysta jednej tkanki może różnicować się w dojrzałą komórkę innej tkanki *in vitro* [42,50]. Potwierdzając ten fakt, udowodniono, że komórki macierzyste krwi pochodzenia mezodermalnego mogą utworzyć miocyty, także mezodermalne, a także wywodzące się z ektodermy, neurony [1, 16,25,50]. Natomiast komórki macierzyste układu nerwowego mogą się różnicować w komórki krwi [11]. Przeprowadzone pod tym kątem badania obaliły tezę, iż tylko embrionalne komórki macierzyste są zdolne do różnicowania się w komórki więcej niż jednej tkanki.

DOJRZAŁE KOMÓRKI MACIERZYTE W WYBRANYCH TKANKACH

Śródbłonek

Identyfikacja śródbłonkowych komórek macierzystych jest dość trudna zarówno w zarodku jak i w dorosłym organizmie. Podczas rozwoju zarodka, zaraz po gastrulacji z mezodermy kształtuje się komórka nazywana hemangioblastem, która jest postrzegana jako prekursor zarówno hematopoetycznych, jak i śródbłonkowych linii komórkowych [7, 24,32,35].

W szpiku kostnym ludzi dorosłych odnaleziono komórki przypominające morfologicznie zarodkowe hemangioblasty. Nowo odkryte komórki nazwano śródbłonkowymi komórkami macierzystymi [52]. Naturę szpikowych hemangioblastów potwierdzono eksperymentalnie:

- ludzkie komórki macierzyste śródbłonka wyizolowane ze szpiku podano dożylnie szczurowi z wywołaną chorobą niedokrwienną serca. Stwierdzono, że migrują one do uszkodzonego organu i tworzą w nim nowe naczynia krwionośne,



- w podobnych badaniach przeprowadzonych na myszy udowodniono, że pochodzące ze szpiku hemangioblasty odtwarzają nie tylko naczynia krwionośne, lecz także kardiomiocyty integrujące do tkanki gospodarza [7].

Trzustka

Ostatnie badania nad rozwojem embrionalnym udowodniły, że zarówno trzustka jak i wątroba rozwijają się z pojedynczej komórki endodermy.

Oba te organy są złożone z wielu typów komórek, które mogą być repopulowane i regenerowane przez wielorakie typy komórek macierzystych [19]. Jednakże status komórek macierzystych w trzustce jest niejasny. Podejrzewa się, że komórki macierzyste występują w przewodach trzustkowych lub znajdują się wśród komórek wysepkowych. Z multipotentnych komórek macierzystych przewodów trzustkowych powstają komórki endo- i egzokrynne, groniaste oraz budujące te przewody. Komórki te wykazują również zdolność do neogenezy [13,25]. Oznacza to, że pojedyncza komórka macierzysta może dać początek nowej wysepce. Równocześnie stwierdzono, że komórki macierzyste występujące w wysepkach trzustki, ekspresjonujące nestynę mogą różnicować się we wszystkie typy komórek wysepkowych oraz w komórki o fenotypie hepatocytów [4, 13,50,68]. Macierzyste komórki wysepkowe wykazują dużą zdolność do różnicowania *in vitro* w kierunku hepatocytów pod wpływem onkostatyny M i deksametazonu. Natomiast owalne komórki wątroby w obecności czynnika wzrostu keratynocytów różnicują się w komórki wysepki Langerhansa [25,50]. Izolacja oraz dokładna charakteryzacja trzustkowych komórek macierzystych jest utrudniona ze względu na brak odpowiednich markerów. Wśród znaczników zaproponowanych do charakterystyki wysepkowych komórek progenitorowych należy wymienić między innymi: cytokeratynę, β -galaktozydazę, PDX-1, hydroksylazę tyrozynową (TH), transporter glukozy GLUT 2 [13].

HEMATOPOETYCZNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Hematopoetyczna komórka macierzysta – HSCs (hematopoietic stem cells) to komórka wyizolowana z krwi obwodowej lub szpiku kostnego, która może się różnicować w wyspecjalizowane komórki krwi. Komórka HSC jest multipotentna, ponieważ może się różnicować w osiem do dziesięciu odrębnych linii komórek potomnych oraz ma dużą zdolność do proliferacji [14,38,58].

Istnieją dwa typy komórek HSC. Typ I to komórki macierzyste długookresowe, które mają zdolność do samoodnowy i potrafią odtworzyć wszystkie komórki układu krążenia w przeciągu kilku miesięcy [14,20,23,47].

Typ II to komórki, które regenerują układ krwionośny w bardzo krótkim okresie, nie mają jednak zdolności długookresowej samoodnowy. Zostały one nazwane krótkookresowymi komórkami progenitorowymi [2, 14,20, 23, 47,64].

Hematopoetyczne komórki macierzyste migrują ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, jednakże występują tam w bardzo małej liczbie 1:10000 komórek, a pod względem

morfologicznym nie różnią się od leukocytów. Podstawowym sposobem odróżnienia ich od pozostałych komórek krwi jest obecność lub brak charakterystycznych markerów powierzchniowych [2, 14, 37]. HSCs nie wykazują ekspresji wielu antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla zróżnicowanych komórek krwi, tzw. „markerów linii“.

Wszystkie komórki HSC wykazują obecność markerów: CD34, CD59, Thy1 i C-kit natomiast nie mają znacznika CD38 cechującego leukocyty [14,18,30,47]. Obecność markera CD34 stała się główną cechą rozróżniania komórek HSCs, wykorzystywaną do ich izolacji, ponieważ nie występuje on na powierzchni w pełni zróżnicowanych komórek krwi. Sugeruje się, że mogą istnieć ludzkie hematopoetyczne komórki macierzyste nieekspresjonujące tego antygeny. Kolejne markery powierzchniowe komórek HSCs to CD133 i KDR (vascular growth factor receptor 2) [14,63,67].

ŹRÓDŁA OTRZYMYWANIA HEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Szpick kostny

Szpick kostny jest uważany za podstawowe źródło komórek wykorzystywanych w medycynie od ponad 40 lat. Do szerokiej gamy komórek szpiku należą między innymi: komórki stromalne, macierzyste komórki stromalne, krwiotwórcze komórki progenitorowe, dojrzałe i dojrzewające krwinki i inne [44].

Krew obwodowa

Krew obwodowa stała się ostatnio głównym źródłem komórek HSC do celów transplantologicznych. W celu izolacji krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej w dużej ilości, pacjentowi podaje się iniekcyjnie cytokinę GCSF, co powoduje ich migrację ze szpiku do krwi. Następnie pobraną od pacjenta krew przeprowadza się przez system filtrów zawierającą oczyszczony antygen CD34. Komórki niezwiązane z antygenem powracają do krwiobiegu, natomiast zebrana frakcja zawiera między innymi komórki HSC [44]. Hematopoetyczne komórki macierzyste pochodzące z krwi obwodowej szybciej migrują do szpiku kostnego i regenerują układ krwionośny w porównaniu z komórkami HSC pochodzącymi ze szpiku kostnego. Udowodniono, że jest to spowodowane obecnością na ich powierzchni mikrofragmentów błonowych pochodzenia płytkowego PMP (platelet microparticles). PMP to kuliste fragmenty błony zawierające markery powierzchniowe: CD41, CD61, CD62, receptor PAR-1, receptor CXCR4 itp. [41].

Krew pępowinowa

Krew pępowinowa jest płynem ustrojowym bogatym w komórki macierzyste. Ze względu na tę cechę jest gromadzona w tzw. bankach, stanowi nie tylko bardzo ciekawy materiał badawczy, lecz także narzędzie kliniczne. Trwają badania nad potwierdzeniem hipotezy zakładającej, że krew ta zawiera komórki macierzyste zdolne do utworzenia trzech listków zarodkowych [27,39].

Głównym ograniczeniem szerszego zastosowania komórek HSCs w terapii są trudności w utrzymywaniu tych komórek *in vitro* w stanie niezróżnicowanym oraz warunków różnicowania w kierunku wymaganej linii [39].

Wątroba

Wątroba jest organem o bardzo dużej zdolności do samoregeneracji tkanki po zaistniałym uszkodzeniu. Podczas rozwoju embrionalnego hepatocyty powstają z pojedynczej komórki endodermy. Zarodkowe hepatoblasty – bipotencjalne komórki prekursorowe, mają zdolność różnicowania w kierunku hepatocytów i komórek przewodów żółciowych [65]. Progenitorowe komórki owalne, odnalezione w kanalikach Heringa, zachowały powyższą cechę.

W odpowiedzi na uraz lub uszkodzenie różnicują się w komórki wątroby, nie są jednak komórkami macierzystymi, lecz się z nich wywodzą [61,65]. Komórki owalne łączą w sobie cechy morfologiczne obu typów potomnych linii komórkowych. Osiągają wielkość 10 mm, a ich jądro komórkowe ma kształt owalny. Do podstawowych markerów ekspresjonowanych przez komórki owalne należy zaliczyć:

- cytokeratyny: 8 [CK 8], 14 [CK14], 18 [CK18] oraz 19 [CK19],
- α -fetoproteinę [AFP],
- OV-6,
- transferazę glutamylową [26,65].

Na powierzchni komórek owalnych odnaleziono również znaczniki charakterystyczne dla hematopoetycznych komórek macierzystych, takie jak: CD34, Thy-1, flt-3 oraz c-kit. Udowodniono, że hematopoetyczne komórki macierzyste regenerują uszkodzoną wątrobę przekształcając się w hepatocyty. Plastyczność ta jest zapewne wynikiem wspólnych etapów kształtowania wątroby i układu krążenia podczas rozwoju embrionalnego [1, 4, 6].

Naskórek

Naskórek jest tkanką stale odnawianą podczas życia organizmu. Główną rolę w tym dynamicznym procesie odgrywają dzielące się i różnicujące w szybkim tempie komórki macierzyste odnalezione w tzw. warstwie podstawnej naskórka. Tam następuje ich proliferacja, a komórki potomne ulegają różnicowaniu podczas migracji do zewnętrznej warstwy skóry właściwej.

Pierwszym etapem różnicowania dojrzałych keratynocytów jest pula komórek TA (transit-amplifying cell) [34,50]. Komórki te ulegają pięciokrotnym podziałom, po których następuje ich pełne różnicowanie. Ich główną funkcją jest zwiększanie liczby komórek potomnych pochodzących od jednej komórki macierzystej. Głównym markerem naskórkowych linii komórkowych, w tym także komórek macierzystych, jest β 1-integryna. Istnieją dowody sugerujące, że białko to utrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym. Kolejnymi przypuszczalnymi znacznikami naskórkowych komórek macierzystych są:

- α 6-integryna, ekspresjonowana na wysokim poziomie, przy małym stężeniu transferyny,
- białko p63,

- keratyny 19 i 15 oraz β -katenina na wysokim poziomie ekspresji [34].

Trwają badania nad zjawiskiem plastyczności naskórkowych komórek macierzystych. Udowodniono, że komórki pochodzące ze skóry hodowane *in vitro*, tworzyły kolonie w kształcie sfer i ekspresjonowały markery komórek nerwowych [50]. W kolejnych badaniach dowiedziono, że hematopoetyczne komórki macierzyste mogą zasiedlać naskórek i wytwarzać białka charakterystyczne dla keratynocytów [1].

Przewód żołądkowo-jelitowy

Na dzisiejszym etapie badań niewiele wiadomo o lokalizacji i losach komórek macierzystych bytujących w przewodzie żołądkowo-jelitowym. Wynika to głównie z braku odpowiednich markerów charakterystycznych dla tych komórek. Uważa się, że wszystkie zróżnicowane żołądkowo-jelitowe linie komórkowe włączając nabłonek wywodzą się z tych samych komórek macierzystych. Istnieją kilka dowodów na to, że komórki macierzyste rezydują w podstawie krypt Lieberküna, w jelicie cienkim oraz w środkowej części krypt jelita wstępującego i w podstawie krypt jelita zstępującego, w jelicie grubym [15].

KOMÓRKI MACIERZYTE A CUKRZYCA. PRZESZCZEPY KOMÓREK WYSEPKOWYCH WYWODZĄCYCH SIĘ Z KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Cukrzyca należy do grupy chorób charakteryzujących się nieprawidłowo dużym stężeniem cukru we krwi obwodowej, który nie jest wykorzystywany przez organizm. Ten nadmiar glukozy jest odpowiedzialny za większość komplikacji występujących u chorych, między innymi: ślepotę, uszkodzenie nerek, udar, neuropatie, konieczność amputacji kończyn itp. Cukrzyca typu I nazywana także młodzieńczą rozwija się, gdy system immunologiczny pacjenta rozpoznaje komórki własne jako obce, atakuje je i niszczy. W rezultacie komórki wysepkowe wytwarzające insulinę zostają uszkodzone. Brak hormonu powoduje, że glukoza nie może zostać wykorzystana i kumuluje się we krwi. Cukrzyca typu II występuje u chorych, u których insulina jest wydzielana, ale wadliwie działające receptory tego hormonu powodują, że nie może być wykorzystywana przez komórki. Proces ten nazwany opornością na insulinę prowadzi do wzrostu stężenia glukozy we krwi. Rozwój badań nad terapiami komórkowymi w ostatnich latach przyniósł nadzieję na możliwość opracowania metod hodowli *in vitro* komórek trzustki z komórek macierzystych i wszczepiania ich do uszkodzonej tkanki organu. Trwają badania nad możliwością stworzenia komórek trzustki zarówno z embrionalnych, jak i z dojrzałych komórek macierzystych.

ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DLA TERAPII CUKRZYCOWYCH

Progenitorowe komórki przewodów trzustkowych

Wielu badaczy uważa, że przewody trzustkowe zawierają multipotentne komórki macierzyste, które mogą różnicować się w komórki trzustki wydzielające insulinę [13,68]. Udowodniono, że komórki przewodów wyizolowane z dojrzałej ludzkiej trzustki mogą być zaindukowane w hodowli *in vitro* do różnicowania się w komórki wysepkowe wydzie-



lające hormony. Komórki te odpowiadały sekrecją insuliny na niskim poziomie, gdy stężenie glukozy w podłożu było małe, lecz wzrost dawki pociągał za sobą zwiększenie ilości syntetyzowanego hormonu. Wyprowadzona w ten sposób linia komórkowa stanowi obiecujące narzędzie do transplantacji w przypadku chorych na cukrzycę typu I [13].

Embrionalne komórki macierzyste

W ostatnich latach wysunięto hipotezę zakładającą, że komórki ES mogą zostać zaindukowane do różnicowania, którego wynikiem będzie linia komórkowa trzustkowych komórek wysepkowych wydzielających insulinę. Podstawowym założeniem tej teorii jest konieczność stosowania genetycznych modyfikacji w genomie komórek macierzystych prowadzących do ochrony przeszczepu przed odrzuceniem [40]. Obecnie trwają badania nad terapiami komórkowymi na diabetycznych myszach z użyciem mysich komórek macierzystych. Prowadzone równoległe prace udowodniły, że ludzkie komórki ES również wytwarzają komórki potomne wydzielające insulinę [8]. Komórki β trzustki pojawiają się w tworzonych spontanicznie ciałach embrioidalnych. Ustalono również, że czynnik wzrostu nerwu jest kluczowym sygnałem dla ko-

mórek ES powodującym ich kierunkowe różnicowanie w komórki wysepkowe trzustki [33,36].

Terapie komórkowe stanowią obecnie przedmiot wielu badań mających na celu opracowanie nowatorskich metod leczenia wielu chorób między innymi cukrzycy. Pomimo ogromnego postępu w badaniach i wciąż poszerzanej na ten temat wiedzy, nadal nie jesteśmy w stanie odpowiedzieć na wiele nurtujących pytań [59].

Szeroko rozumiany temat komórek macierzystych łączy zainteresowania wielu badaczy wśród nich lekarzy, immunologów, biologów molekularnych, genetyków. Zanim jednak ustalone zostaną konkretne sposoby leczenia konieczne jest jak najdokładniejsze poznanie natury komórek macierzystych, ich morfologii, genetyki i szlaków metabolicznych oraz ustalenie czynników indukujących kierunkowe różnicowanie, metod hodowli otrzymanych linii itp. Dziedzina ta rozwija się w bardzo szybkim tempie i z każdym dniem przybywa informacji. Większość ustalonych zagadnień na temat komórek macierzystych dotyczy badań laboratoryjnych *in vitro*. W najbliższej przyszłości konieczne będzie poznanie przebiegu tych samych procesów w organizmach żywych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abkowitz J.L.: Can human hematopoietic stem cell become skin, gut or liver cells? *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 770-771
- [2] Akashi K., Traver D., Kondo M., Weissman I.L.: Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int. J. Hematol.*, 1999; 69: 217-226
- [3] Alison M.R., Poulosom R., Forbes S., Wright N.A.: An introduction to stem cells. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 419-425
- [4] Alison M.R., Poulosom R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J., Wright N.A.: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000; 406: 257
- [5] Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., Chiu C.P., Harris C.P., Waknitz M.A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J.A.: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.*, 2000; 227: 271-278
- [6] Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L.: Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.*, 2001; 7: 393-395
- [7] Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275: 964-967
- [8] Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K.L., Tzukerman M.: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*, 2001; 50: 1691-1697
- [9] Bianco P., Gehron R.P.: Stem cell in tissue engineering. *Nature*, 2001; 414: 118-121
- [10] Bishop A.E., Lee D.K., Polak J.M.: Embryonic stem cells. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 424-429
- [11] Bjorson C.R., Reitze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science*, 1999; 283: 534-537
- [12] Blau H.M., Brazelton T.R., Weissman J.M.: The evolving concept of stem cell: entity or function. *Cell*, 2001; 105: 829-841
- [13] Bonner-Weir S., Sharma A.: Pancreatic stem cell. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 519-526
- [14] Bonnet D.: Haematopoietic stem cells. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 430-440
- [15] Brittan M., Wright N.A.: Gastrointestinal stem cell. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 492-509
- [16] Chandross K.J., Mezey E.: Plasticity of adult bone marrow stem cells. *CT: JAI Press, Greenwich*, 2001
- [17] Cogle C.R., Guthrie S.M., Sanders R.C., Allen W.L., Scott E.W., Petersen B.E.: An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin. Proc.*, 2003; 8: 993-1003
- [18] Craig W., Kay R., Culter R.B., Lansdorp P.M.: Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.*, 1993; 177: 1331-1342
- [19] Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lora J., Zaret K.S.: A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*, 2001; 128: 871-881
- [20] Domen J., Weissman I.L.: Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today*, 1999; 5: 201-208
- [21] Donovan P.J., Gearhart J.: The end of the beginning for pluripotent stem cell. *Nature*, 2002; 1: 92-97
- [22] Donovan P.J.: The germ cell-the mather of all stem cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 1998; 42: 1043-1050
- [23] Ema H., Takano H., Sudo K., Nakauchi H.: *In vitro* self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 1281-1288
- [24] Forrai A., Robb L.: The hamangioblast-between blood and vessels. *Cell Cycle*, 2003; 2: 86-90
- [25] Forbes S.J., Vig P., Poulosom R., Wright N.A., Alison M.R.: Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clinical Science*, 2002; 103: 355-369
- [26] Forbes S.J., Vig P., Poulosom R., Thomas H., Alison M.R.: Hepatic stem cells. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 510-518
- [27] Gallacher L., Murdoch B., Wu D., Karanu F., Fellows F., Bhatia M.: Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. *Blood*, 2000; 96: 1740-1747
- [28] Garry D.J., Masino A.M., Messon A.P., Martin C.M.: Stem cell biology and therapeutic applications. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2003; 12: 447-454
- [29] Gearhart J.: New potential for human embryonic stem cells. *Science*, 1998; 282: 1061-1062
- [30] Hao Q.L., Smogorzewska E.M., Barsky L.W., Crooks G.M.: *In vitro* identification of single CD34+/CD38- cells both lymphoid and myeloid potential. *Blood*, 1998; 91: 4145-4152
- [31] Hakelien A.M., Collas P.: Novel approaches of transdifferentiation. *Cloning Stem Cells*, 2002; 4: 379-387
- [32] Hirashima M., Kataoka H., Nishikawa S., Matsuyoshi N., Nishikawa S.: Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood*, 1999; 93: 1253-1263

- [33] Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N.: Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.*, 2000; 6: 88-95
- [34] Janes S.M., Lowell S., Hutter C.: Epidermal stem cells. *Review J. Pathol.*, 2002; 196: 497-491
- [35] Keller G.: *The hemangioblast*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor-New York, 2001; 329-348
- [36] Keller G.M.: *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1995; 7: 862-869
- [37] Kim D.K., Fujiki Y., Fukushima T., Ema H., Shibuya A., Nakauchi H.: Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells*, 1999; 17: 286-294
- [38] Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S.J.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001; 105: 369-377
- [39] Lewis I.D.: Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Review. Int. Med. J.*, 2002; 32: 601-609
- [40] Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R.: Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science*, 2001; 292: 1309-1599
- [41] Majka M., Kubiczek K., Stec M., Jarocha D., Ratajczak M.Z.: Nowe aspekty transplantologiczne ludzkich komórek hematopoetycznych. *Post. Biol. Komórki*, 2001; 28(Suplement): 221-229
- [42] Mariani S.M.: Stem Cells: Dream or Reality? Highlight from the American Society of Hematology 44th Annual Meeting; Philadelphia, USA, 06-10.12.2002. Conference Report 2003
- [43] Mariani S.M.: Stem Cells: A Plenary Policy Forum. Highlight from the American Society of Hematology 44th Annual Meeting; Philadelphia, USA, 06-10.12.2002. Conference Report 2003
- [44] Moore K.A., Ema H., Lemischka I.R.: *In vitro* maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*, 1997; 89: 4337-4347
- [45] Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A.: Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001; 19: 193-204
- [46] Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A.: Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.*, 2000; 113: 5-10
- [47] Philips R.L., Ernst R.E., Brunk B.: The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*, 2000; 288: 1635-1640
- [48] Pirelle K., Zink N., Wolf E.: Pluripotent stem cells-model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat. Histol. Embriol.*, 2002; 31: 169-186
- [49] Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143-147
- [50] Poulosom R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *Review. J. Pathol.*, 2002; 197: 441-456
- [51] Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A.: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotechnol.*, 2000; 18: 399-404
- [52] Reyes M., Dudek A., Jahaginar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M.: Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 337-346
- [53] Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Melton D.A., Benvenisty N.: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000; 97: 11307-11312
- [54] Shambloott M.J., Axelman J., Littlefield J.W., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Cui Y., Cheng L., Gearhart J.D.: Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 98: 113-118
- [55] Smith A. G.: Embryo-derived stem cell: of mice and men. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001; 17: 435-462
- [56] Thomson J.A., Odorico J.S.: Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol.*, 2000; 18: 53-57
- [57] Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282: 1145-1147
- [58] Uher F., Hajdu M., Vas V.: Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: a molecular approach. *Review. Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 2003; 50: 3-21
- [59] Van der Kooy D., Weiss S.: Why stem cells? *Science*, 2000; 287: 1439-1441
- [60] Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M.: Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology*, 2002; 1: 369-400
- [61] Vessey C.J., de la Hall P.M.: Hepatic stem cell: a review. *Pathology*, 2001; 33: 130-141
- [62] Xu C., Inokumi M.S., Denham J.: Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotech.*, 2001; 19: 971-974
- [63] Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.M.: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cell. *Blood*, 1997; 90: 5002-5012
- [64] Zandstra P.W., Lauffenburger D.A., Eaves C. J.: A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood*, 2000; 96: 1215-1222
- [65] Zhang Y., Bai X.F., Huang C.X.: Hepatic stem cells: existence and origin. *World. J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 201-204
- [66] Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colepietro A.M.: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.*, 2001; 7: 1028-1034
- [67] Ziegler B.L., Valtieri M., Almeida-Porada G.: KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*, 1999; 285: 553-558
- [68] Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., Daniel P.B., Moritz W., Muller B., Vallejo M., Thomas M.K., Habener J.F.: Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, 2001; 50: 521-533

