

Received: 2008.01.17
Accepted: 2008.10.21
Published: 2008.12.02

Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne

Regulation and direction of umbilical cord blood stem cells differentiation and their therapeutic application

Katarzyna Roszek, Michał Komoszyński

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

Krew pępowinowa stanowi bogate źródło komórek macierzystych o wysokim potencjale proliferacyjnym. Z krwi pępowinowej można wyizolować co najmniej trzy rodzaje komórek macierzystych: komórki hematopoetyczne, mezenchymalne oraz podobne do embrionalnych. Ich wspólną cechą jest zdolność do samoodnawiania, jednak w specyficznych warunkach komórki macierzyste mogą różnicować się w odrębne typy dojrzałych komórek. Procesy samoodnawiania i różnicowania są precyzyjnie kontrolowane. Poznanie czynników i szlaków sygnałowych uczestniczących w tych procesach pozwoli sterować różnicowaniem komórek macierzystych *ex vivo*, co umożliwi użycie ich w terapii wielu schorzeń.

Słowa kluczowe:

komórki macierzyste • krew pępowinowa • różnicowanie • zastosowanie terapeutyczne

Summary

Umbilical cord blood is a rich source of stem cells with great proliferative potential. There are at least three kinds of stem cells in the umbilical cord blood: hematopoietic, mesenchymal, and embryonic-like stem cells. Each of them is capable of self-renewal, but under special conditions they can differentiate into distinct types of mature cells. The self-renewal and differentiation processes are precisely regulated by numerous factors and signaling pathways. Knowledge of all these factors will allow us to direct stem cell differentiation *ex vivo* and apply stem cells in the therapy of various diseases.

Key words:

stem cells • umbilical cord blood • differentiation • therapeutic application

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=873382>

Word count:

2893

Tables:

2

Figures:

2

References:

55

Adres autorki:

dr Katarzyna Roszek, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: kroszek@biol.uni.torun.pl



WPROWADZENIE

Komórki macierzyste to niewyspecjalizowane komórki, zdolne do podziału i samoodnawiania (self-renewal) przez nieograniczony czas. Pod wpływem działania odpowiednich czynników mogą się przekształcić w różne typy dojrzałych komórek [46,47]. Dzięki tym cechom, komórki macierzyste są obiektem zainteresowań wielu badaczy oraz umożliwiają poznanie mechanizmów regulujących rozwój embrionalny, różnicowanie komórek i regenerację narządów.

Ze względu na pochodzenie, komórki macierzyste możemy podzielić na dwa główne typy:

1. Zarodkowe komórki macierzyste (embryonal stem cells – ESC) do doświadczeń są izolowane najczęściej z węzła zarodkowego blastocysty 4–5-dniowych zarodków. Są to komórki pluripotencjalne, co oznacza, że mogą się przekształcać w niemal każdy typ komórek organizmu [51]. Komórki macierzyste zarodka, ze względu na nieograniczone możliwości różnicowania, wydają się najciekawszym materiałem do badań, chociaż ze względów etycznych stanowią materiał o ograniczonej dostępności.

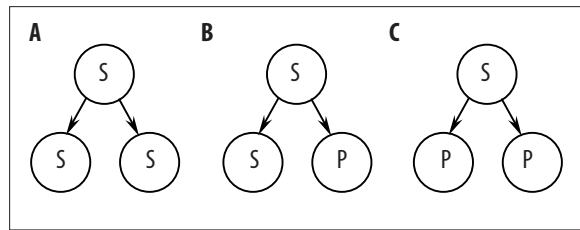
Dotychczas pobranie komórek macierzystych z węzła zarodkowego wiązało się ze zniszczeniem blastocysty. Duże nadzieje wiąże się z tym, iż udało się uzyskać ludzkie zarodkowe komórki macierzyste z pojedynczego blastomeru, nie powodując przy tym obumarcia zarodka [9]. Wyprowadzone z blastomeru linie komórek macierzystych cechuje pluripotencjalność i zdolność do przekształcenia w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych.

2. Komórki macierzyste izolowane z dojrzałych organizmów (adult stem cells) znajdują się w niewielkich ilościach w szpiku kostnym, trzustce, wątrobie, naskórku, rogówce i siatkówce oka, gdzie są odpowiedzialne za ich regenerację. Multi- lub unipotencjalne, mogą się przekształcać w komórki określonej linii komórkowej lub w komórki tkanki, z której pochodzą [51]. Do tego typu komórek zalicza się także komórki macierzyste obecne we krwi pępowinowej. Komórki macierzyste krwi pępowinowej są bardziej pierwotne, multi- a nawet pluripotencjalne, mogą się więc różnicować w wiele typów dojrzałych komórek [54].

W obrębie organizmu komórki macierzyste są umiejscowione w tzw. niszach, czyli regionach macierzy zewnątrzkomórkowej, regulujących proliferację i różnicowanie obecnych tam komórek. Swoiste połączenia przylegające (adherens junctions) kotwiczą komórki macierzyste do otaczających je dojrzałych komórek. Znaczącą rolę w rozwoju komórek macierzystych odgrywa obecność w obrębie niszy zarówno dojrzałych komórek oraz wydzielanych przez nie czynników wzrostu, jak i białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Poznanie i zrozumienie złożonych oddziaływań w obrębie niszy pozwoli na kontrolę wzrostu i różnicowania komórek macierzystych w hodowlach *ex vivo* [40,54].

KONTROLA RÓZNICOWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Zdolność komórek macierzystych zarówno do samoodnawiania, jak i do przekształcania się we wszystkie rodzaje komórek budujących organizm (czyli różnicowania), sta-



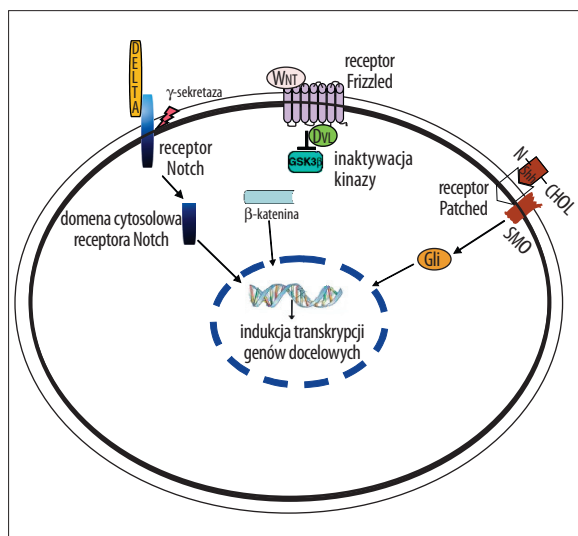
Ryc. 1. Typy podziału komórek macierzystych: (A) podział symetryczny z zachowaniem cech komórki macierzystej, (B) podział asymetryczny, (C) podział symetryczny prowadzący do powstania komórek progenitorowych; S – komórka macierzysta, P – częściowo zróżnicowana komórka progenitorowa

nowią ich unikalną cechą. Znajomość czynników nadających komórkom macierzystym taki potencjał jest wciąż niewystarczająca. Ponadto, ten sam czynnik lub szlak sygnałowy może zarówno pobudzać jak i hamować różnicowanie, w zależności od rodzaju komórek bądź otaczającego je środowiska [24].

Komórki macierzyste mogą podlegać symetrycznym podziałom na dwie macierzyste komórki potomne [36] (ryc. 1A). Podział taki jest podstawą namnażania komórek macierzystych *in vivo* oraz w hodowli. Podział asymetryczny (ryc. 1B) umożliwia samoodnawianie komórek macierzystych z jednoczesnym powstaniem częściowo zróżnicowanej komórki progenitorowej. Natomiast podział symetryczny prowadzi do wytworzenia dwóch potomnych komórek progenitorowych (ryc. 1C), co zmniejsza pulę komórek macierzystych, kierując je na drogę różnicowania [36]. Utrzymanie przez komórki macierzyste zdolności do samoodnawiania wymaga zaangażowania wielu szlaków sygnałowych oraz czynników transkrypcyjnych, z których najlepiej poznane zostaną omówione poniżej.

Szlak sygnalizacyjny **Notch** stanowi ewolucyjnie konserwatywny, a więc uniwersalny mechanizm regulacji aktywności genów, pozwalający na kontrolowanie proliferacji i różnicowania komórek. Białka Notch tworzą rodzinę receptorów błonowych, spotykanych powszechnie u bezkręgowców oraz kręgowców. Podobnie jak sam receptor, ligandy Notch są konserwatywnymi białkami integralnymi błony (ryc. 2). U *Drosophila* występują dwa ligandy (Serrate, Delta) zdolne do aktywacji receptora Notch, kodowanego przez pojedynczy gen. Ssaki mają aż cztery geny kodujące receptor (Notch1 – Notch4) oraz pięć ligandów [11]. Receptor Notch jest integralnym białkiem błonowym typu I. Składa się z trzech domen strukturalnych – zewnątrzkomórkowej, transbłonowej oraz cytoplazmatycznej. W wiązaniu ligandów uczestniczy, obecny w domenie zewnątrzkomórkowej, wielokrotnie powtarzający się motyw epidermalnego czynnika wzrostu (EGF).

Po związaniu liganda receptor Notch ulega obróbce proteolitycznej. W wyniku działania γ -sekretazy uwolniona zostaje domena cytoplazmatyczna receptora, zawierająca sygnał lokalizacji jądrowej (NLS). Po przemieszczeniu do jądra komórkowego domena ta aktywuje transkrypcję docelowej grupy genów. Ekspresja receptorów Notch i ich ligandów zachodzi w wielu typach komórek, a zakres procesów rozwojowych regulowanych przez te białka jest bardzo szeroki [48]. Aktywacja szlaku Notch jest koniecz-



Ryc. 2. Najważniejsze szlaki sygnalizacyjne uczestniczące w kontroli różnicowania komórek macierzystych (szczegóły w tekście)

na do utrzymania zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania przez zahamowanie procesów różnicowania [36]. Jednak wiele zróżnicowanych linii komórkowych wymaga obecności aktywnego receptora Notch, co sugeruje także udział tego białka w utrzymaniu odpowiedniego kierunku różnicowania komórek. U ssaków receptory Notch są zaangażowane m.in. w regulację funkcji komórek krwiotwórczych [48].

W kontroli różnicowania komórek macierzystych, oprócz szlaku Notch, główną rolę odgrywają także szlaki sygnalizacyjne Wnt i Shh [36] (ryc. 2).

Szlak sygnalizacyjny **Wnt** funkcjonuje w komórkach macierzystych różnych tkanek, zapewniając im zdolność do samoodnawiania i ochronę przed różnicowaniem [24,36]. Białka Wnt to rodzina wydzielanych poza komórkę konserwatywnych białek, wchodzących w ściśle interakcje z glikozaminoglikanami macierzy zewnątrzkomórkowej. Białka te wywołują odpowiedź biologiczną poprzez związanie z powierzchniowymi receptorami okolicznych komórek. Receptorami Wnt są białka z rodziny Frizzled. Receptory te siedmiokrotnie przechodzą przez błonę komórkową, a ich domena zewnątrzkomórkowa, bogata w reszty cysteiny, stanowi miejsce interakcji z Wnt [24].

Przy braku Wnt, cytosolowe białko β-katenina jest fosforylowane z udziałem kinazy syntazy glikogenu (GSK3-β), po czym ulega ubikwitynacji i zostaje zdegradowane. Związanie Wnt z receptorem Frizzled prowadzi do aktywacji białka z rodziny Dishevelled (izoformy Dvl-1 do 3 w komórkach ssaków), które inaktywuje GSK3-β, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania degradacji β-kateniny [24]. Ulega ona przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie asocjuje z odpowiednimi czynnikami transkrypcyjnymi i indukuje transkrypcję genów docelowych. Obecnie znanych jest ponad 100 różnych genów podlegających kontroli szlaku sygnałowego opartego na białku Wnt [55].

Szlak sygnalizacyjny aktywowany przez białko **Shh** (sonic hedgehog homolog) stanowi konserwatywny mecha-

nizm, zaliczany do podstawowych elementów regulacji rozwoju embrionalnego ssaków [53]. Szlak ten jest zaangażowany także w kontrolę proliferacji i determinację różnicowania komórek macierzystych, zwłaszcza mezenchymalnych i neuronalnych [25]. Główną rolę w sygnalizacji pełni domena N-końcowa białka Shh. Modyfikacja posttranslacyjna czynnika Shh polega na zablokowaniu C-końca polipeptydu przez dołączenie reszty cholesterolu oraz na palmitylacji N-końcowej reszty cysteiny. Ta ostatnia modyfikacja jest niezbędna do aktywności sygnałowej białka Shh [15].

Receptorami Shh są błonowe białka z rodziny Patched (Ptc) o 12 domenach transmembranowych. Aktywacja szlaku sygnalizacyjnego znosi supresję błonowego białka SMO, które z kolei aktywuje czynniki transkrypcyjne z rodziny Gli, wywołujące aktywację docelowych genów. U ssaków w transdukcję sygnału z udziałem białek Shh są zaangażowane dwie postaci receptora (Ptc1 and Ptc2) oraz co najmniej trzy różne białka Gli (Gli-1, -2 i -3) [53]. Rezultaty najnowszych badań wskazują, iż aktywacja szlaku Shh stymuluje proliferację embrionalnych komórek macierzystych myszy poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, a następnie aktywację kinazy białkowej C i fosforylację receptora EGF [18].

Kontrolę proliferacji i różnicowania komórek macierzystych niezwiązaną z aktywacją receptorów zapewniają obecne w komórce czynniki transkrypcyjne, m.in. Oct-4, Sox2 i Nanog.

Białko Oct-4 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych POU (Pit-Oct-Unc), wyodrębnionej na podstawie wspólnego planu budowy domeny wiążącej DNA. Oct-4 wiąże się z DNA w pewnej odległości od miejsca inicjacji transkrypcji, regulując w ten sposób ekspresję określonych genów. W zależności od genu docelowego, Oct-4 może wymagać obecności dodatkowych białek np. czynnika transkrypcyjnego podobnego do E1A lub białka Sox2 [38, 41]. Oct-4 aktywuje proliferację i utrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym. *In vivo* ulega ekspresji jedynie w komórkach wężła zarodkowego blastocysty i jest niezbędny do zapewnienia komórkom pluripotentjalności. W hodowlach *in vitro* obecność czynnika transkrypcyjnego Oct-4 stwierdza się wyłącznie w komórkach macierzystych o charakterze pluripotentjalnym, natomiast nie występuje on w dojrzałych, wyspecjalizowanych komórkach [36]. Czynnikiem Oct-4 jest więc uniwersalnym wewnątrzkomórkowym znacznikiem pluripotentjalnych komórek macierzystych.

Białko **Nanog** ulega ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych i uznawane jest za główny czynnik samoodnawiania tych komórek, utrzymujący je w stanie pluripotentcji. Prawidłowe funkcjonowanie białka Nanog wymaga często obecności dodatkowych czynników transkrypcyjnych, takich jak POU5F1 czy Sox2 [41]. Białko Nanog jest zbudowane z 305 aminokwasów, z których 60 (poz. 95–155) tworzy konserwatywny motyw umożliwiający interakcję z DNA. Region N-końcowy białka bogaty jest w reszty seryny, treoniny i proliny [41]. Nadekspresja białka Nanog w komórkach ESC zwiększa ich aktywność proliferacyjną, powodując jednocześnie utrzymanie pluripotentjalnego charakteru komórek [10]. Supresja genu

Tabela 1. Wybrane białka markerowe ulegające ekspresji na powierzchni komórek macierzystych i dojrzałych pochodzących z krwi pępowinowej [12,23]

Marker	Typ komórek	Funkcja białka markerowego
CD34	HSC	glikoproteina błonowa uczestnicząca w adhezji komórek
CD38	dojrzałe komórki leukocytów	nieobecny na HSC, selekcja komórek CD34+/CD38– umożliwia oczyszczenie HSC
CD44	MSC	białko adhezji komórkowej
CD90	MSC	białko powierzchniowe nieobecne na HSC
CD105	MSC	glikoproteina błonowa
CD117 (c-kit)	HSC, MSC	białko receptorowe, aktywacja receptora wzmacnia proliferację komórek macierzystych
CD135	HSC	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej, reguluje hematopoezę
Alkaliczna fosfataza	ESC oraz komórki o charakterze embrionalnym (np. VSEL)	podwyższona aktywność enzymu cechuje komórki pluripotencjalne
Lin	dojrzałe linie erytrocytów i leukocytów	nieobecny na HSC i MSC, selekcja komórek Lin– umożliwia precyzyjne oczyszczenie komórek macierzystych
TER-119	dojrzałe erytrocyty	ulega ekspresji jedynie w dojrzałych erytrocytach
SSEA-4	ESC oraz komórki o charakterze embrionalnym (np. VSEL)	glikoproteina błonowa

przez wiążące się z regionem promotorowym białko p53 i brak ekspresji białka Nanog, promuje różnicowanie komórek macierzystych. Potwierdza to jego rolę jako czynnika niezbędnego w procesie samoodnawiania [30].

W hodowlach komórkowych czynnik Oct-4 wraz z białkiem Nanog są wystarczające do utrzymania embrionalnych komórek macierzystych w stanie niezróżnicowanym [36].

KOMÓRKI MACIERZYTE KRWI PĘPOWINOWEJ

Krew pępowinowa jest przede wszystkim bogatym źródłem **hematopoetycznych komórek macierzystych** (hematopoietic stem cells – HSC). Wprawdzie stanowią one zaledwie 0,02–1,42% całkowitej liczby komórek, jednak we krwi obwodowej liczba komórek macierzystych jest mniejsza od 0,02%, a w szpiku kostnym dorosłych waha się 0,5–5% [49]. HSC z krwi pępowinowej znajdują się w fazie G0 cyklu komórkowego, ale mają najwyższą zdolność proliferacyjną w odpowiedzi na cytokiny, głównie interleukiny 3 i 6, trombopoetynę i erytropoetynę [49].

Drugi typ komórek macierzystych obecnych we krwi pępowinowej to komórki niekrwiotwórcze. Wśród nich najliczniejsze są **mezenchymalne komórki macierzyste** (mesenchymal stem/stromal cells – MSC) [6]. Izolowane z różnych tkanek mezenchymalne komórki macierzyste, mimo różnic fenotypowych, cechuje zdolność do adhezji do podłoża oraz kształt zbliżony do fibroblastów [6,29,42].

Z krwi pępowinowej uzyskano także bardziej pierwotne komórki macierzyste o charakterze embrionalnym (embryonic-like) [33,34], które charakteryzują się dużą plastycznością. Ekspozycja na swej powierzchni antygeny uznane

za markery komórek embrionalnych, m.in. SSEA-4 i zawierają białko wewnątrzkomórkowe Oct-4. Komórki te są zdolne do różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych (patrz rozdział „Kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej”). Komórki o charakterze embrionalnym stanowią zaledwie 0,16% wszystkich jednojądrzastych komórek obecnych w krwi pępowinowej [33].

Podobny charakter mają także opisane niedawno pluripotencjalne komórki VSEL (very small embryonic-like). Są to stosunkowo nieliczne, bardzo małe komórki o średnicy 3–5 μm, występujące w szpiku kostnym oraz krwi pępowinowej. Takie niedojrzałe komórki cechuje duży potencjał proliferacyjny, obecność antygeny powierzchniowego SSEA-4 oraz ekspresja białek Oct-4 i Nanog typowych dla komórek ESC. Obecnie badane są możliwości i kierunki różnicowania komórek VSEL [28].

Każdy typ komórek krwi pępowinowej cechuje obecność innego zestawu białek powierzchniowych, co umożliwia ich izolację i identyfikację [26]. Białka swoiste dla danej komórki lub linii komórek pozwalają odróżnić komórki macierzyste hematopoetyczne lub mezenchymalne oraz dojrzałe, zróżnicowane komórki obecne we krwi (tabela 1). Wszystkie markery to białka transbłonowe, których domeny zewnętrzne są eksponowane na powierzchni komórek, stanowiąc swoiste antygeny. Białko CD34 jest uniwersalnym markerem ludzkich hematopoetycznych i progenitorowych komórek macierzystych [4]. Obecne jest wyłącznie na niedojrzałych komórkach krwiotwórczych. W miarę ich różnicowania, ekspresja białka CD34 maleje tak, iż dojrzałe komórki np. limfocyty, monocyty czy granulocyty nie ekspozycją tego antygeny na swej powierzchni.

W przeciwieństwie do komórek hematopoetycznych, mezenchymalne komórki macierzyste nie prezentują jednego, swoistego białka markerowego. Profile ekspresji MSC wskazują na obecność jednego lub kilku z poniższych białek: CD44, CD73, CD90, CD105 oraz brak ekspresji białka CD34 [6,12].

KIERUNKI RÓŻNICOWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH KRWI PĘPOWINOWEJ

Komórki hematopoetyczne krwi pępowinowej to prymitywne prekursorzy komórek wszystkich linii hematopoezy, które zarówno *in vivo* jak *ex vivo* różnicują się w dojrzałe komórki krwi. Pierwsze etapy obejmują przekształcenie w prekursorzy komórek limfoidalnych i mieloidalnych, a następnie w wyspecjalizowane dojrzałe limfocyty T, limfocyty B i komórki NK [2] oraz w monocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile, bazofile, megakariocyty i erytrocyty [3]. Najnowsze badania dowodzą, iż hematopoetyczne komórki macierzyste krwi pępowinowej o immunofenotypie CD34+ mogą także różnicować się *in vivo* w kierunku hepatocytów [13].

Komórki mezenchymalne ulegają typowemu różnicowaniu w komórki pochodzenia mezodermalnego: osteocyty i chondrocyty, komórki mięśniowe oraz adipocyty [12,19,22,45]. Różnicowanie hodowli MSC w określonym kierunku wymaga zastosowania swoistych czynników wzrostu oraz związków o charakterze czynników różnicujących, takich jak deksametazon, β -glicerofosforan czy kwas askorbinowy [5,29,45].

Wykazano także, że ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste z krwi pępowinowej różnicują się *in vitro* w kardiomiocyty. Po 5 dniach hodowli w obecności mysich kardiomiocytów, komórki mezenchymalne uległy zróżnicowaniu, zaczęły się rytmicznie kurczyć a 45% z nich zawierało troponinę I i koneksynę 43 – białka typowe dla komórek mięśnia sercowego [39,44].

Z frakcji niekrwiotwórczych (CD 34-), jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej wyizolowano także populację komórek macierzystych, różnicujących *in vitro* w kierunku komórek nerwowych. Dojrzałe komórki cechowała ekspresja typowych dla neuronów białek receptorów: acetylocholinowych, serotoninowych, GABA- i dopaminergicznych [7, 8].

Komórki macierzyste o charakterze embrionalnym obecne w ludzkiej krwi pępowinowej mogą stanowić prekursorzy komórek wątroby. Podstawowymi czynnikami stymulującymi różnicowanie się hodowli komórek macierzystych w kierunku hepatocytów są czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-4) oraz czynnik wzrostu hepatocytów (HGF). Po 6 tygodniach hodowli w komórkach następuje wzrost poziomu ekspresji białek markerowych hepatocytów m.in. albuminy, cytokeratyny 18 i α -fetoproteiny [34]. Komórki macierzyste o charakterze embrionalnym są także zdolne do różnicowania w komórki nerwowe i glejowe, co świadczy o dużej plastyczności tych komórek [33].

Z komórek macierzystych o charakterze embrionalnym uzyskano również komórki tworzące *in vitro* struktury podobne do wysp trzustkowych i wytwarzające insulinę oraz peptyd C [50]. Skupiska komórek pojawiają się około dziewiątego dnia hodowli w obecności kwasu retinowego, nikotynami-

du, EGF oraz eksendyny 4. Komórki te wykazują ekspresję białek markerowych charakterystycznych dla komórek beta trzustki – Glut-2, PDX1 oraz Pax4 [14].

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH KRWI PĘPOWINOWEJ

Krew pępowinowa, ze względu na łatwość pozyskania, stanowi doskonałe źródło hematopoetycznych i mezenchymalnych komórek macierzystych. Komórki macierzyste krwi pępowinowej są bardziej pierwotne i mniej ukierunkowane niż komórki macierzyste dorosłego organizmu oraz zawierają duży potencjał proliferacyjny [33]. Są także w znikomym stopniu uszkodzone np. promieniowaniem czy mutagenami środowiskowymi [42].

Duży potencjał proliferacyjny i dostępność hematopoetycznych komórek macierzystych krwi pępowinowej spowodowały, że stały się one materiałem wykorzystywanym do przeszczepów zamiast szpiku kostnego. Niewątpliwą zaletą przeszczepu krwi pępowinowej jest mniejsze ryzyko zakażeń wirusowych oraz to, że komórki macierzyste znajdują się w krwi pępowinowej w obecności niedojrzałego systemu limfocytów T, co warunkuje występowanie mniejszej liczby przypadków reakcji „przeszczep przeciw gospodarzowi” (GVHD) [16,35]. Wadą jest niewielka liczba komórek macierzystych w jednostce krwi pępowinowej, dlatego prowadzi się badania nad optymalizacją hodowli i namrażaniem tych komórek *ex vivo* oraz nad możliwością łączenia krwi pępowinowej od różnych dawców [20].

Pierwszego przeszczepu krwi pępowinowej dokonano w 1988 r. w Paryżu. Biorcą był 6-letni chłopiec z anemią typu Fanconiego, dawcą – siostra chłopca, u której w badaniu prenatalnym wykluczono istniejący u brata defekt genetyczny. Po kilku dniach we krwi chłopca pojawiły się krwinki pochodzące z wszczepionych komórek macierzystych, chłopiec został uznany za wyleczonego i żyje do dnia dzisiejszego [16,27]. Wykorzystanie hematopoetycznych komórek macierzystych krwi pępowinowej w leczeniu anemii i białaczek weszło już do praktyki medycznej (tabela 2). Pierwszego przeszczepu w Polsce dokonano w 1993 r. u chłopca chorego na białaczkę limfoblastyczną. Dotychczas na całym świecie wykonano prawie 8000 przeszczepów krwi pępowinowej [17].

Obecnie duże nadzieje wiąże się także z pozyskiwaniem niekrwiotwórczych (mezenchymalnych oraz podobnych do embrionalnych) komórek macierzystych z krwi pępowinowej i badaniem kierunków ich różnicowania. W przeciwieństwie do MSC pozyskiwanych np. ze szpiku kostnego, mezenchymalne komórki macierzyste z krwi pępowinowej są bardziej pierwotne i wykazują większy potencjał proliferacyjny. W komórkach tych stwierdza się wysoki poziom ekspresji białek Oct-4, Nanog, SSEA-3 i -4, uważanych za markery pluripotencjalności komórek macierzystych. Ponadto MSC z krwi pępowinowej cechuje duża aktywność telomerazy i dłuższe telomery [6].

Uzyskane w ostatnich latach wyniki badań wskazują, iż mezenchymalne komórki macierzyste krwi pępowinowej mogą być prekursorami komórek wszystkich trzech listków zarodkowych. Taki potencjał budzi nadzieje na zastosowanie niekrwiotwórczych komórek macierzystych w medycy-



Tabela 2. Choroby obecnie leczone lub możliwe do leczenia za pomocą przeszczepu krwi pępowinowej [35]

Rodzaj schorzenia	
Hematologiczne	neutropenia autoimmunologiczna anemia Fanconiego anemia hipoproliferacyjna pancytopenia młodzieńcze zapalenie skórno-mięśniowe aplazja układu czerwonych krwinek
Onkologiczne	ostra białaczka limfoblastyczna ostra białaczka mieloidalna choroba Hodgkina (ziarnica złośliwa) zespoły mielodysplastyczne
Metaboliczne	adrenoleukodystrofia choroba Gauchera choroba Krabba choroba Niemana-Picka choroba Wolmana metachromatyczna leukodystrofia mukopolisacharydoza typu II i III choroba Taya-Sachsa zespół Maroteaux-Lamy mukopolisacharydoza
Niedobory immunologiczne	ataksja-teleangiektazja ciężki złożony niedobór odporności (SCID) SCID z niedoborem deaminazy adenozynowej hipogammaglobulinemia zespół Wiscotta-Aldricha zespół DiGeorga zespół Kostmanna zespół nagich limfocytów zespół Omenna

nie regeneracyjnej i terapii wielu chorób, np. regeneracji mięśnia sercowego po zawale, przeszczepach wątroby, leczeniu chorób neurodegeneracyjnych lub cukrzycy.

W praktyce klinicznej są podejmowane próby stosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu wrodzonej łamliwości kości (osteogenesis imperfecta) lub skomplikowanych urazów. W takich przypadkach stosuje się autologiczne przeszczepy MSC, które przyspieszają odtworzenie tkanki kostnej lub chrzęstnej [6,19].

Liczne eksperymenty na gryzoniach wskazują, iż mezenchymalne komórki macierzyste krwi pępowinowej wspomagają leczenie chorób serca oraz regenerację mięśnia sercowego po zawale. Wszczepione bezpośrednio do mięśnia sercowego mogą inicjować wytwarzanie czynników wzrostu (zwłaszcza VEGF i FGF), zastępować uszkodzone komórki oraz tworzyć środowisko sprzyjające odnowie kardiomiocytów [19,37].

Badania na mysich i szczyrzach modelach niedokrwienia mózgu lub chorób neurodegeneracyjnych wykazały, że

wszczepienie komórek macierzystych krwi pępowinowej wspomaga odbudowę uszkodzonej tkanki oraz opóźnia rozwój choroby [6]. W literaturze opisano, jak dotąd jedyny, przypadek 37-letniej kobiety po urazie rdzenia kręgowego, której wszczepiono komórki macierzyste z krwi pępowinowej. Badanie tomograficzne przeprowadzone 41 dni po transplantacji komórek wykazało wyraźną regenerację tkanki w uszkodzonym obszarze rdzenia kręgowego [21].

W badaniach tego rodzaju stosuje się jednak wyizolowane wszystkie nieodróżnicowane komórki jednojądrzaste krwi pępowinowej albo pełną krew. Brak więc dowodów bezpośrednich na to, że to właśnie MSC pełnią istotną funkcję terapeutyczną w powyższych przypadkach [12].

Zdolność różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych, zarówno *in vitro* jak *in vivo*, w komórki wątroby lub trzustki, stwarza możliwość zastosowania MSC w regeneracji tych narządów [43]. W przypadku urazów oraz wrodzonych dysfunkcji wątroby przeszczep organu stanowi często jedyną możliwość leczenia, ograniczoną jednak niewielką liczebnością dawców. Z tego względu zastosowanie terapii opartych na komórkach macierzystych stanowi atrakcyjną alternatywę [32].

Uzyskanie z mezenchymalnych komórek macierzystych komórek zdolnych do wytwarzania insuliny *in vivo* może natomiast stać się skutecznym sposobem leczenia cukrzycy. W przypadku cukrzycy typu 1 zwraca się uwagę na wykorzystanie nie tylko potencjału naprawczego, ale także właściwości immunomodulacyjnych mezenchymalnych komórek macierzystych [1].

Mezenchymalne komórki macierzyste odgrywają istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej organizmu. Hamują nieswoiste proliferację limfocytów T i B oraz komórek NK, a tym samym wykazują właściwości immunosupresyjne [52]. Daje to możliwość zastosowania tych komórek w leczeniu chorób autoimmunologicznych oraz GVHD, zwłaszcza że prowadzone dotychczas próby na zwierzęcych modelach tych schorzeń dały pozytywne rezultaty [6,19].

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą również stanowić doskonałe narzędzie terapii genowej. Odpowiednio zmodyfikowane stają się nośnikami genów. Dotychczas udało się uzyskać MSC wytwarzające dopaminę i wykorzystywane w mysich modelach choroby Parkinsona oraz MSC z genem ludzkiej erytropoetyny [6]. Prowadzone są także badania nad wprowadzaniem do mezenchymalnych komórek macierzystych innych genów, np. GFP czy lucyferazy, co pozwoliłoby na monitorowanie lokalizacji tak znakowanych komórek *in vivo* [31].

Krew pępowinowa może więc stanowić doskonałe, łatwo dostępne i nie budzące kontrowersji źródło komórek macierzystych wykorzystywanych zarówno w leczeniu anemii i białaczek (komórki hematopoetyczne) jak i w medycynie regeneracyjnej, terapii genowej lub chorób o podłożu immunologicznym (komórki niekrwiotwórcze).

PIŚMIENICTWO

- [1] Abdi R., Fiorina P., Adra C.N., Atkinson M., Sayegh M.H.: Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008; 57: 1759–1767
- [2] Akashi K., Traver D., Kondo M., Weissman I.L.: Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int. J. Hematol.*, 1999; 69: 217–226
- [3] Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L.: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000; 404: 193–197
- [4] Antosz H.: Antygen CD34 i komórki CD34 pozytywne. *Post. Biol. Kom.*, 2004; 31: 285–298
- [5] Bieback K., Kern S., Klüter H., Eichler H.: Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004; 22: 625–634
- [6] Bieback K., Klüter H.: Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2007; 2: 310–323
- [7] Buzańska L., Jurga M., Domańska-Janik K.: Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener. Dis.*, 2006; 3: 19–26
- [8] Buzańska L., Jurga M., Stachowiak E.K., Stachowiak M.K., Domańska-Janik K.: Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.*, 2006; 15: 391–406
- [9] Chung Y., Klimanskaya I., Becker S., Li T., Maserati M., Lu S.-J., Zdravkovic T., Ilic D., Genbacev O., Fisher S., Krtolica A., Lanza R.: Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2008; 2: 113–117
- [10] Darr H., Maysyar Y., Benvenisty N.: Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*, 2006; 133: 1193–1201
- [11] Fiuza U.M., Arias A.M.: Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.*, 2007; 194: 459–474
- [12] Flynn A., Barry F., O'Brien T.: UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy*, 2007; 9: 717–726
- [13] Fujino H., Hiramatsu H., Tsuchiya A., Niwa A., Noma H., Shiota M., Umeda K., Yoshimoto M., Ito M., Heike T., Nakahata T.: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/̳ mice through cell fusion. *FASEB J.*, 2007; 21: 3499–3510
- [14] Gao F., Wu D.Q., Hu Y.H., Jin G.X., Li G.D., Sun T.W., Li F.J.: *In vitro* cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl. Res.*, 2008; 151: 293–302
- [15] Goetz J.A., Suber L.M., Zeng X., Robbins D.J.: Sonic hedgehog as a mediator of long-range signaling. *BioEssays*, 2002; 24: 157–165
- [16] Goldstein G., Toren A., Nagler A.: Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity. *Curr. Med. Chem.*, 2006; 13: 1249–1259
- [17] Haylock D.N., Nilsson S.K.: Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation. *Stem Cell Res. Ther.*, 2007; 2: 324–335
- [18] Heo J.S., Lee M.Y., Han H.J.: Sonic hedgehog stimulates mouse embryonic stem cell proliferation by cooperation of Ca²⁺/protein kinase C and EGF receptor as well as Gli1 activation. *Stem Cells*, 2007; 25: 3069–3080
- [19] Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V.: Adult mesenchymal cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med.*, 2007; 53: 121–127
- [20] Jędrzejczak W.W., Urbanowska E., Rokicka M., Król M., Król M., Torosjan T., Tomaszewska A., Paluszewska M., Gronkowska A.: Wstępna ocena możliwości wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych pozyskanych z różnych dawców krwi pępowinowej do jednoczesnego przeszczepienia u biorców dorosłych. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30(Supl.21): 139–147
- [21] Kang K.S., Kim S.W., Oh Y.H., Yu J.W., Kim K.Y., Park, H.K., Song C.H., Han H.: A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*, 2005; 7: 368–373
- [22] Kang X.Q., Zang W.J., Bao L.J., Li D.L., Xu X.L., Yu X.J.: Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Cell Biol. Int.*, 2006; 30: 569–575
- [23] Kirschstein R., Skirboll L.R. Kirschstein R., Skirboll L.R.: Stem cell markers. W: *Stem cells: scientific progress and future research directions*. NIH Report, Bethesda 2001, E1–E11
- [24] Kleber M., Sommer L.: Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 681–687
- [25] Kondo T., Johnson S.A., Yoder M.C., Romand R., Hashino E.: Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4789–4794
- [26] Kopec-Szlezak J., Podstawka U.: Komórki hematopoetyczne CD34+ krwi pępowinowej. *Acta Haematol. Polon.*, 2001; 32: 61–69
- [27] Kortyczko E., Dyduch A.: Krew pępowinowa – bezcenne źródło komórek macierzystych. *Wiad. Lek.*, 2003; 56: 359–361
- [28] Kucia M., Halasa M., Wysoczyński M., Baskiewicz-Masiuk M., Moldenhawer S., Zuba-Surma E., Czajka R., Wojakowski W., Machaliński B., Ratajczak M.Z.: Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood. *Leukemia*, 2007; 21: 297–303
- [29] Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H.: Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 2004; 103: 1669–1675
- [30] Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S.J., Murphy M.E., Appella E., Xu Y.: p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 165–171
- [31] Lu F.Z., Fujino M., Kitazawa Y., Uyama T., Hara Y., Funeshima N., Jiang J.Y., Umezawa A., Li X.K.: Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 2005; 146: 271–278
- [32] Lysy P.A., Campard D., Smets F., Najimi M., Sokal E.M.: Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J. Gastroenterol.*, 2008; 14: 864–875
- [33] McGuckin C., Forraz N., Baradez M.O., Basford C., Dickinson A.M., Navran S., Hartgerink J.D.: Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2006; 66: 321–329
- [34] McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L.: Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.*, 2005; 38: 245–255
- [35] Moise K.J. Jr.: Umbilical cord stem cells. *Obstet. Gynecol.*, 2005; 106: 1393–1407
- [36] Molofsky A.V., Pardal R., Morrison S.J.: Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 700–707
- [37] Nesselmann C., Ma N., Bieback K., Wagner W., Ho A., Kontinen Y.T., Zhang H., Hinescu M.E., Steinhoff G.: Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008; 12: 1795–1810
- [38] Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A.: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998; 95: 379–391
- [39] Nishiyama N., Miyoshi S., Hida N., Uyama T., Okamoto K., Ikegami Y., Miyado K., Segawa K., Terai M., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A.: The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Stem Cells*, 2007; 25: 2017–2024
- [40] Ohlstein B., Kai T., Decotto E., Spradling A.: The stem cell niche: theme and variations. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 693–699
- [41] Pan G., Thomson J.A.: Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*, 2007; 17: 42–49
- [42] Pojda Z., Machaj E.K., Gajkowska A., Oldak T., Jastrzewska M.: Badanie potencjalnej przydatności klinicznej komórek macierzystych uzyskiwanych z krwi pępowinowej. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30(Supl.21): 127–137
- [43] Porada C.D., Zanjani E.D., Almeida-Porada G.: Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2006; 1: 365–369
- [44] Prat-Vidal C., Roura S., Farré J., Gálvez C., Llach A., Molina C.E., Hove-Madsen L., Garcia J., Cinca J., Bayes-Genis A.: Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant. Proc.*, 2007; 39: 2434–2437



- [45] Qiao C., Xu W., Zhu W., Hu J., Qian H., Yin Q., Jiang R., Yan Y., Mao F., Yang H., Wang X., Chen Y.: Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol. Int.*, 2008; 32: 8–15
- [46] Ramalho-Santos M., Willenbring H.: On the origin of the term “stem cell”. *Cell Stem Cell*, 2007; 1: 35–38
- [47] Sikora M.A., Olszewski W.L.: Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 202–208
- [48] Sitnik K., Cichy J.: Udział techniki warunkowej inaktywacji genów opartej na systemie Cre-loxP w postępie wiedzy na temat roli receptorów Notch. *Post. Bioch.*, 2006; 52: 49–55
- [49] Stec M., Jarocho D., Zembala M.: Optymalizacja metod izolacji i ekspansji komórek CD34+ krwi pępowinowej. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30(Supl.21): 103–114
- [50] Sun B., Roh K.H., Lee S.R., Lee Y.S., Kang K.S.: Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 354: 919–923
- [51] Tuch B.E.: Stem cells: a clinical update. *Aust. Fam. Physician*, 2006; 35: 719–721
- [52] Tyndall A., Walker U.A., Cope A., Dazzi F., De Bari C., Fibbe W., Guiducci S., Jones S., Jorgensen C., Le Blanc K., Luyten F., McGonagle D., Martin I., Bocelli-Tyndall C., Pennesi G., Pistoia V., Pitzalis C., Uccelli A., Wulffraat N., Feldmann M.: Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9: 301–310
- [53] Villavicencio E.H., Walterhouse D.O., Iannaccone P.M.: The sonic hedgehog-patched-Gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000; 67: 1047–1054
- [54] Weiss M.L., Troyer D.L.: Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2006; 2: 155–162
- [55] Wnt target genes, <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html> (05.10.2008)