

PRACA REDAKCYJNA

Agnieszka Banaś

Komórki macierzyste – perspektywy i zagrożenia

Z Instytutu Pielęgniarstwa i Położnictwa
Wydziału Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego

Komórki macierzyste stanowią rezerwuuar komórek o różnym stopniu rozwoju, potencjalności i zróżnicowania, mają zdolność regenerowania uszkodzonych narządów i organów. W pewnych warunkach komórki macierzyste mogą się wyróżnicować w wyspecjalizowane tkanki i organy. Są samowystarczalne i mogą się odnawiać przez długi czas. To sprawia, że są bardzo rokującym nadzieję narzędziem na powstanie terapii przeciw chorobom, takim jak choroba wątroby, zawał serca, uszkodzenie kręgosłupa, udar mózgu, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, zwyrodnienie siatkówki, cukrzyca i inne. Komórki macierzyste można zakwalifikować do trzech grup: embrionalne, płodowe i dorosłego człowieka. Każda z tych grup wykazuje różny potencjał i możliwości zastosowania. Komórki embrionalne mają największy potencjał. Wiele barier jednak, jak na przykład tworzenie teratom, a w konsekwencji nowotworów, problemy z immunokompatybilnością, jak również problemy etyczne powstrzymują ich zastosowanie. Komórki dorosłego człowieka są bardzo obiecującym narzędziem na stworzenie terapii komórkowej, zwłaszcza że ich użytek nie wiąże się z jakimikolwiek problemami etycznymi, nowotworzeniem, czy ryzykiem odrzucenia. W pracy przedstawiono perspektywy, nadzieje, jak również zagrożenia i limitacje związane ze stosowaniem różnych komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, embrionalne komórki macierzyste, mezenchymalne komórki macierzyste, transplantacja komórek macierzystych, terapia autologicznymi komórkami macierzystymi

Stem cells – perspectives and dangers

Stem cells compose a „reservoir” of potential cells at various stages of development that can be used for the restoration and regeneration of damaged tissues and organs. Under proper conditions, stem cells may differentiate into specialized tissues and organs. They are self-sustaining and can replicate themselves for a long time. These unique features make them a promising tool for studies on therapy for diseases such as chronic liver disease, heart stroke, spinal injuries, stroke, Parkinson’s disease, Alzheimer’s disease, retinal degeneration, diabetes mellitus and many others. Stem cells can be classified into three major categories according to their developmental status: embryonic as well as fetal and adult (postnatal). Each represents diverse differentiation potentials and different potential applications. Embryonic stem cells have enormous potential. Many limitations, however, such as teratoma formation followed by tumorigenesis, immunogenicity, and ethical issues, are hampering their clinical usage.

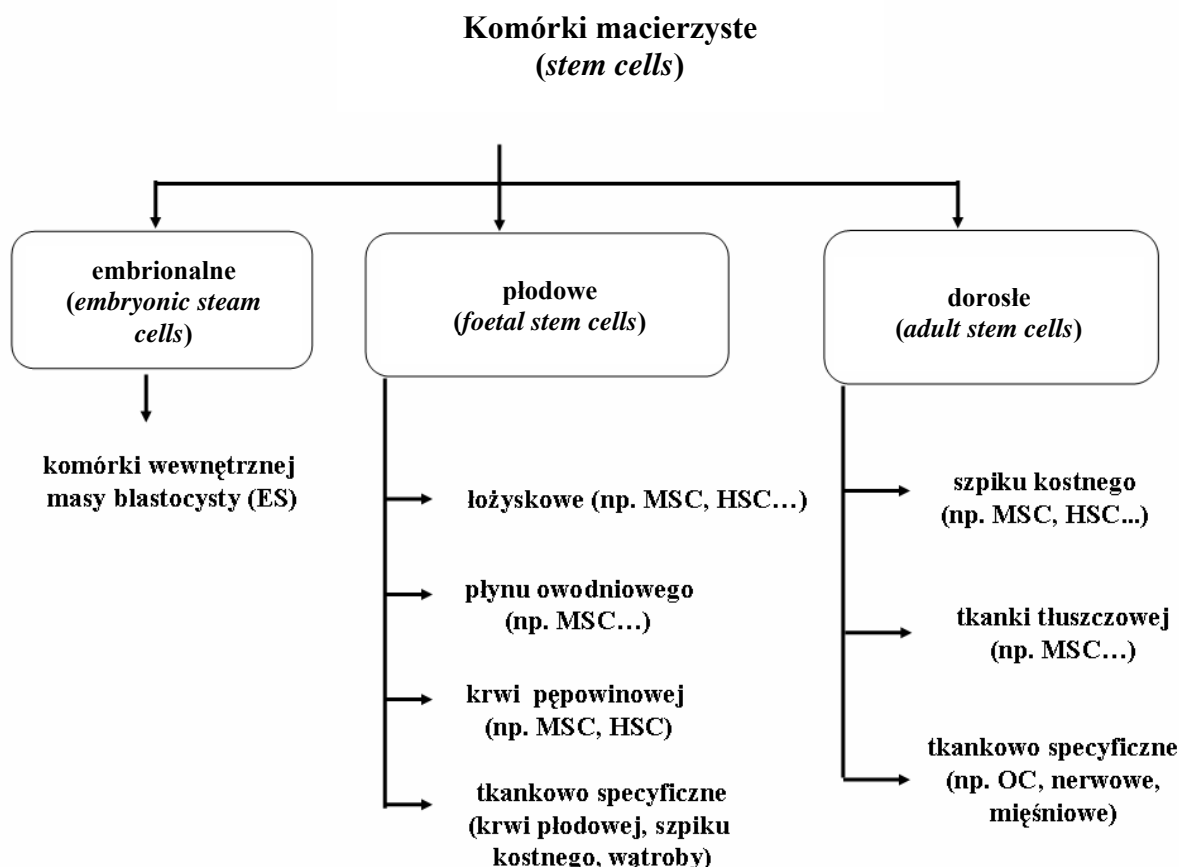
Adult human stem cells are promising candidates for the development of stem cell-based therapies, and their usage sidesteps obstacles such as ethical concerns and risks of rejection.

In this manuscript presented perspectives, hopes as well as dangers and limitations regarding the usage of stem cells..

Key words: Stem cells, Embryonic stem cells, Mesenchymal stem cells, Stem cell transplantation, Autologous stem cells therapy

Trudno znaleźć w ostatnich latach bardziej gorący naukowy temat niż komórki macierzyste. Powodem jest to, że stanowią największą nadzieję

medycyny naszych czasów, ale również największe etyczne dylematy wszechczasów. Otwierają one bowiem możliwości klonowania człowieka,



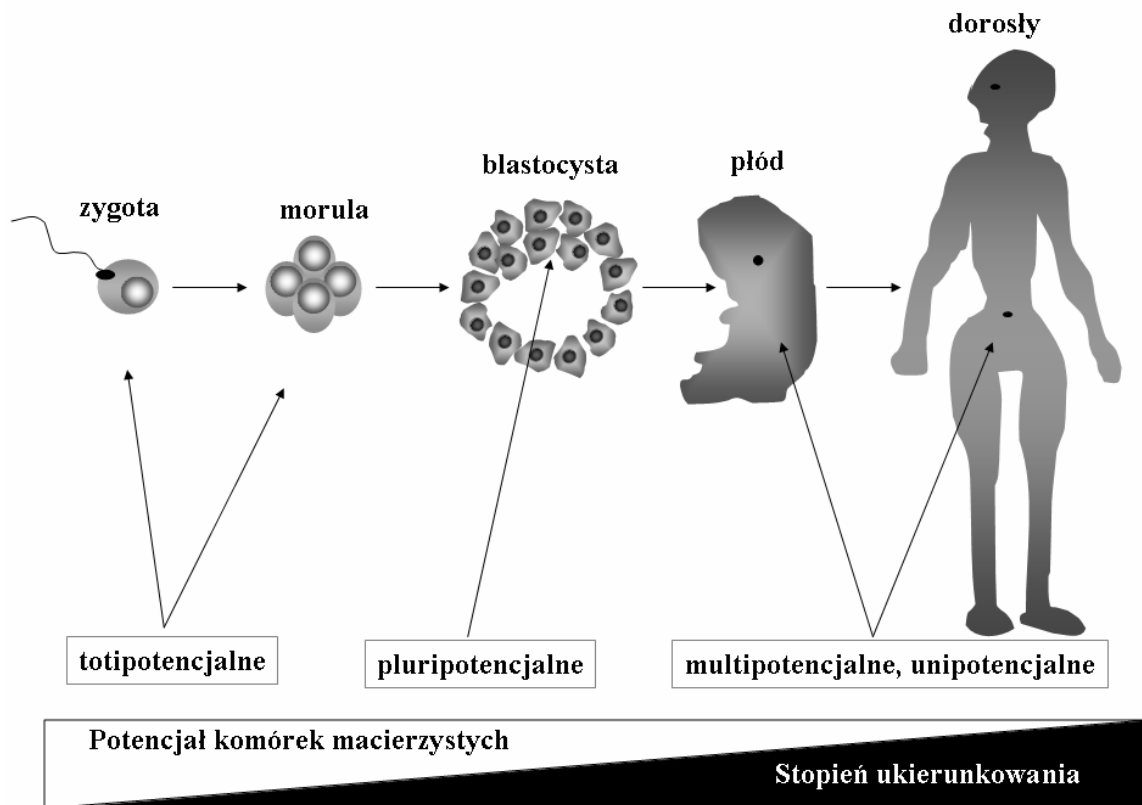
RYC. 1. Podział komórek macierzystych ze względu na pochodzenie

Komórki macierzyste dzielimy na embrionalne (ang. *embryonic stem cells*, *ES cells*), płodowe (ang. *foetal stem cells*) oraz dorosłego (ang. *adult stem cells*). Komórki embrionalne (ES) pochodzą z wewnętrznej masy blastocysty. Do komórek macierzystych pochodzenia płodowego zaliczamy zarówno komórki tkanek płodowych, jak również komórki krwi pępowinowej, łożyska, płynu owodniowego, w tym komórki hemopoetyczne (ang. *hemopoietic stem cells*, *HSC*) oraz mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*, *MSC*). Komórki macierzyste dorosłego człowieka (ang. *adult stem cells*) są obecne w większości tkanek, jako tkankowo specyficzne (multi-, di-, oraz unipotentjalne) komórki macierzyste. Ponadto, w szpiku kostnym i tkance tłuszczowej są obecne w dużej ilości komórki hemopoetyczne i mezenchymalne.

diametralnie odmieniają oblicze medycyny regeneracyjnej. A ponadto, oprócz instytucji naukowych, lekarzy i specjalistów, w problem komórek macierzystych są mocno zaangażowani politycy oraz instytucje komercyjne. Jednocześnie nie są jeszcze poznane długoterminowe skutki negatywne po zastosowaniu terapii komórkami macierzystymi.

Komórki macierzyste, inaczej komórki pnia (ang. *stem cells*) – są zdolne do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i do różnicowania się do innych typów komórek. Inaczej mówiąc, komórki macierzyste są nieśmiertelne, samoodnawialne i o niezwykłym potencjale. Ich odkrycie rokuje w przyszłości wyleczenie dotąd nieuleczalnych chorób, np.: chorobę Parkinsona, cukrzycę, chorobę wątrobową, ciężkie uszkodzenia rdzenia kręgowego, ślepotę, stwardnienie rozsiane i inne. A wszystko to dzięki ich unikalnej zdolności do przekształcania się w inne komórki i tkanki orga-

nizmu w odpowiednim mikrośrodowisku. Właściwość ta zwana jest plastycznością. Ze względu na pochodzenie komórki macierzyste dzielimy na: embrionalne (ang. *embryonic stem cells (ES cells)*) [1–3], płodowe (ang. *foetal stem cells*) [4, 5] i dorosłego człowieka (ang. *adult stem cells*) [6–12] (ryc. 1). Ze względu na stopień potencji (wszechstronność w wytwarzaniu różnorodnych komórek potomnych) komórki macierzyste dzielimy na: toti-, pluri-, multi- i uni-potentjalne (ryc. 2). Największą potencjalność wykazują totipotencjalne komórki macierzyste, które mogą dać początek całemu organizmowi ludzkiemu. W warunkach *in vivo* embrion jest najlepszym przykładem istnienia złożonego z komórek macierzystych. Po zapłodnieniu zygota zaczyna się dzielić i około 4. dnia życia, embrion składa się z 8 blastomerów, które są dosyć luźno ze sobą połączone. Każdy z blastomerów ma charakter



RYC. 2. Podział komórek macierzystych ze względu na stopień potencji

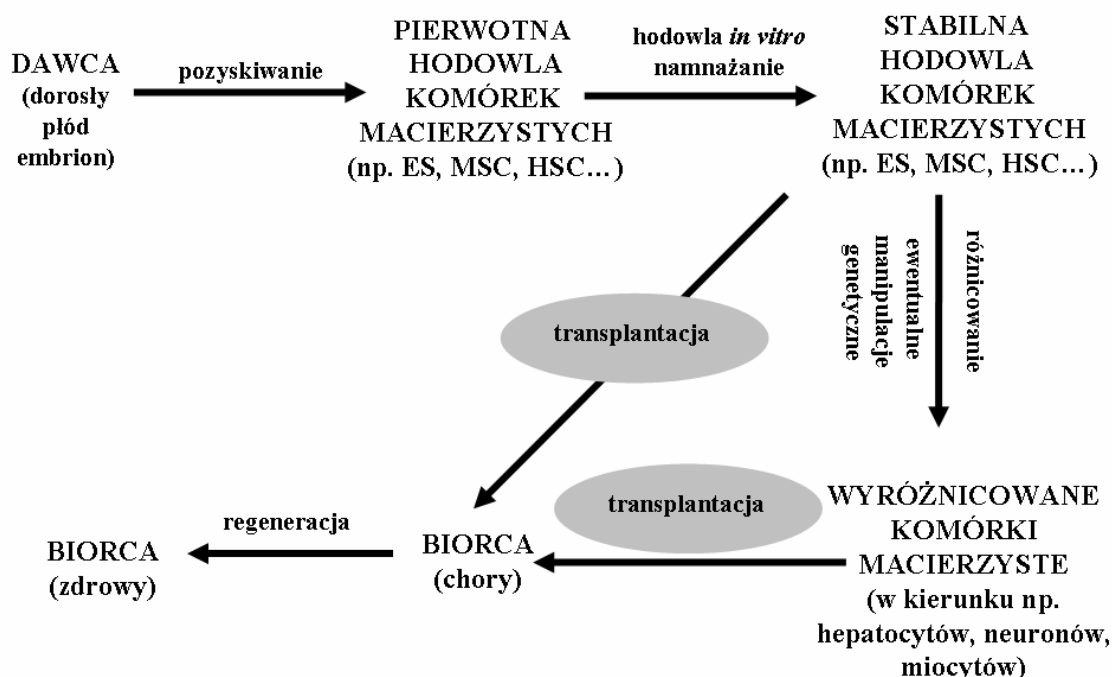
Komórki macierzyste dzielą się na: totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne, i unipotencjalne. Komórki totipotencjalne mają największą potencjalność, mogą dać początek całemu organizmowi ludzkiemu. Po zapłodnieniu zygota zaczyna się dzielić i około 4. dnia życia, embriion składa się z 8 blastomerów, które są dosyć luźno ze sobą połączone (stadium moruli). Każdy z blastomerów ma charakter totipotencjalny. Z każdego z nich może powstać nowy organizm. W dalszych podziałach dochodzi do procesu różnicowania między komórkami: część z nich zaczyna tworzyć wewnętrzną grupę komórek (ang. *inner cell mass, ICM*), a pozostałe komórki – rozmieszczone obwodowo – część zewnętrzną. Komórki tworzące wewnętrzną grupę komórek (ICM) to pluripotencjalne komórki macierzyste, zwane embrionalnymi komórkami macierzystymi (ang. *embryonic stem cells (ES cells)*) (stadium blastocysty). Komórki te mogą się dać początek każdej komórce ludzkiego organizmu. W dalszym etapie rozwoju komórki macierzyste w organizmie człowieka tracą pluripotencję, specjalizują się w poszczególne linie rozwojowe, osiągając stan multipotencjalności. Płód, jak i człowiek dorosły, posiada rezerwar multipotencjalnych i unipotencjalnych komórek macierzystych. Multipotencjalne komórki macierzyste mogą dać początek komórkom jednej linii zarodkowej. Unipotencjalne komórki macierzyste mogą dać początek komórkom tylko jednego rodzaju, czyli regenerują daną tkankę lub narząd.

totipotencjalny. Z każdego z nich może powstać nowy organizm. W dalszych podziałach dochodzi do procesu różnicowania między komórkami: część z nich zaczyna tworzyć wewnętrzną grupę komórek (ang. *inner cell mass, ICM*), a pozostałe komórki – rozmieszczone obwodowo – część zewnętrzną. Z części wewnętrznej powstaje właściwy embriion, natomiast z zewnętrznej kształtuje się trofoblast (później łożysko), odpowiedzialny za kontakt embriionu z organizmem matki. Wyszczególnienie tych dwóch typów komórek w obrębie embriionu oznacza osiągnięcie etapu istnienia zwanego blastocystą. Liczy ona zwykle od 100–150 niewyspecjalizowanych komórek. Komórki tworzące wewnętrzną grupę komórek (ICM) to pluripotencjalne komórki macierzyste, zwane embrionalnymi komórkami macierzystymi (ang. *embryonic stem cells (ES*

cells)). Komórki te mogą dać początek każdej komórce ludzkiego organizmu. W dalszym etapie rozwoju komórki macierzyste w organizmie człowieka tracą pluripotencję, specjalizują się w poszczególne linie rozwojowe, osiągając stan multipotencjalności. W każdej tkance płodu i dorosłego człowieka, istnieją multi-, tri-, di- i unipotencjalne komórki macierzyste. Tak więc, wraz z rozwojem ontogenetycznym, organizm ludzki zyskuje coraz bardziej ukierunkowane, wyspecjalizowane zespoły komórek, a sukcesywnie traci „możność” i potencję komórek macierzystych (Ryc. 2). Wraz z wiekiem potencjalność komórek macierzystych dorosłego człowieka i zdolność do samoodnowy się zmniejsza.

Ludzkie komórki macierzyste potencjalnie można uzyskiwać: a) z embriionów ludzkich uzyskiwanych metodą zapłodnienia *in vitro*, b) z embriionów

Terapia komórkami macierzystymi (stem cells based therapy)



RYC. 3. Ogólny schemat przedstawiający terapię przy wykorzystaniu komórek macierzystych

Komórki macierzyste (embrionalne, płodowe lub dorosłego człowieka) mogą być izolowane od dawcy, namnażane *in vitro* i transplantowane do chorego jako niezróżnicowane komórki macierzyste, albo po namnożeniu mogą być ukierunkowane (wyróżnicowane) i transplantowane do chorego jako już wyróżnicowane komórki danego rodzaju. Po transplatacji komórek uszkodzony narząd się regeneruje i pacjent zdrowieje.

uzyskiwanych metodą klonowania, c) z tkanki płodu po poronieniu czy aborcji, d) z krwi pępowinowej, łożyska lub płynu owodniowego podczas porodu, e) z dorosłego organizmu ludzkiego. Pojawiają się także doniesienia, że komórki macierzyste można uzyskiwać ze zwłok.

TERAPIA KOMÓRKAMI MACIERZYSTYMI - PERSPEKTYWY

Przełom w medycynie regeneracyjnej, jaki niesie ze sobą odkrycie komórek macierzystych i wiedza o ich izolacji, selekcji i hodowli, polega na tym, że komórki te mogą potencjalnie zastąpić wszystkie komórki organizmu ludzkiego. Ma to olbrzymie znaczenie w terapii chorób chronicznych, degeneracyjnych, produkcji sztucznych narządów (ang. *bio-artificial organs*) oraz w rekonstrukcji organów po wypadkach. Komórki macierzyste można pozyskać z różnych źródeł (embryon, płód, krew pępowinowa, tkanka tłuszczowa i inne), następnie namnożyć do wymaganej ilości, różnicować i transplantować do chorego. Różnicowanie komórek macierzystych zachodzi w obecności czynników symulujących

odpowiednie mikrośrodowisko *in vivo*, tzw. niszę komórek macierzystych (ang. *stem cell niche*). Do takich czynników należą czynnik wzrostu i różnicowania komórek, cytokiny, chemokiny i inne stymulatory (ryc. 3). Komórki te sprawdza się pod kątem funkcjonalności, żywotności, markerów powierzchniowych, a następnie implantuje do chorego. Komórki po wyróżnicowaniu tracą swoją multi-/ pluripotencję, w związku z tym zmniejsza się ryzyko powstania nowotworu. Perspektywy i możliwości zwiększają się z uwagi na współpracę naukowców z różnych dziedzin. Takim przykładem może być połączenie biologów komórki ze specjalistami od inżynierii tkankowej i biomateriałów biodegradowalnych. Hodowle w trzech wymiarach (3D, ang. *three dimensional*), z wykorzystaniem odpowiedniego rusztowania (ang. *scaffolds*) stwarzają warunki podobne do warunków *in vivo* [13, 14].

Nowym odkryciem jest wykazanie, iż rusztowania tkankowe (ang. *tissue scaffolds*) powstałe z ozbawionych komórek tkanek wpływa na róż-

nicowanie komórek macierzystych w komórki i struktury, które są charakterystyczne dla tkanki, z której przygotowano matrycę [14]. Oznacza to, iż wszczepiając rusztowania tkankowe wzbogacone w odpowiednie cytokiny i ligandy dla molekuł adhezyjnych można odtwarzać tkanki i narządy (ang. *bioartificial organs*) *in vitro*. Strategia ta jest z powodzeniem stosowana w przypadku leczenia ran skóry.

Komórki macierzyste dorosłego człowieka można pobierać od chorego dawcy z jednego źródła, np. szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej i implantować z powrotem do chorego w miejsce regenerującego się narządu. Taka terapia zwie się terapią autologicznymi komórkami macierzystymi i cieszy się wielkim zainteresowaniem naukowców i lekarzy.

POSTĘP I ZAGROŻENIA ZWIĄZANE ZE STOSOWANIEM EMBRIONALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (*ES CELLS*)

Duże zainteresowanie komórkami pochodzącymi z wczesnych stadiów embrionalnych, spowodowane jest tym, że komórki te są liczne, proliferują *in vitro* potencjalnie nieskończoną ilość razy oraz posiadają cechę toti- lub pluripotencjalności [1–3, 15]. Pozyskanie embrionalnych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, *ES cells*) wiąże się jednak z destrukcją embrionu.

W pierwszym z możliwych sposobów uzyskania komórek embrionalnych wykorzystuje się drogę sztucznego zapłodnienia metodą *in vitro*. Ponieważ komórki po zapłodnieniu nie są implantowane do organizmu kobiety, traktuje się je jako źródło do pozyskiwania komórek macierzystych. W tym celu tworzy się najpierw zewnętrzne warunki rozwojowe, aby embriony te mogły w warunkach laboratoryjnych rozwinać się do poziomu blastocysty. Wówczas pobiera się wewnętrzną masę komórkową, co jest równoznaczne ze zniszczeniem embrionu. Następnie komórki te hoduje się na odpowiednim podkładzie organicznym tak, aby mnożyły się, tworząc kolonie zwane embroidami (ang. *embryoid bodies*, *EBs*). Proces ten kontynuuje się aż do powstania linii komórek macierzystych zdolnych do nieskończonego mnożenia się.

W przypadku komórek embrionalnych otrzymywanych metodą zapłodnienia *in vitro*, konieczne jest pokonanie bariery zgodności tkankowej u ewentualnych biorców przeszczepów, które pochodzą z tych komórek.

Zespół naukowców z centrum badawczego Advanced Cell Technology w Worcester (USA), kierowany przez Roberta Lanza wykazał, że można z rozwijającego się embrionu w stadium moruli, pobrać (przy użyciu metody zbliżonej do biopsji zapłodnionej komórki jajowej), pojedyncze blastomery, nie dokonując zniszczenia embrionu [16]. Zespół ten najpierw przeprowadził eksperyment na embrionach myszy, udowadniając, że pobrane pojedyncze komórki mogą rozwinąć się w linie embrionalnych komórek macierzystych. Następnie podobny eksperyment przeprowadzono na embrionach ludzkich. Spośród 43 biopsji blastomerów, 36 (83%) rozwinęło się w zdrowe 5-dniowe embriony. Jest to duży procent w stosunku do eksperymentów z zapłodnieniami *in vitro*. Metoda ta, jak autorzy zapewniają, nie różni się od prenatalnych rutynowych badań genetycznych, ale jest jeszcze niedoskonała. Co więcej, istnieją obawy, że pobranie pojedynczych komórek z moruli może zmniejszyć szansę na pomyślną implantację embrionu. Pobranie pojedynczego blastomeru, albo paru blastomerów, może bowiem naruszyć równowagę całości nowego organizmu. Ponadto, nieznane są efekty długoterminowe takiego działania dla zdrowia rozwijającego się człowieka. Mogą się one ujawniać dopiero na etapie postnatalnym. Jednak zasadnicze obiekcje do tego typu działań pojawiają się na płaszczyźnie etycznej. Oddzielone od embrionu komórki mają możliwość stać się nowym życiem, czyli utworzyć nowy embrion. Ich totipotencjalny charakter w pełni na to pozwala. Tak więc oddzielony blastomer nie może być traktowany wyłącznie jako cenny materiał biologiczny, ale jako potencjalne nowe życie.

W celu uniknięcia bariery zgodności tkankowej, proponuje się również wykorzystanie metody klonowania metodą wymiany jądra (ang. *somatic nuclear transfer*) [17–19]. Polega ona na enukleacji komórki jajowej, czyli oocyty i wprowadzenie w jego miejsce jądra z innej dowolnej somatycznej (2n) komórki dawcy. Wówczas bez udziału plemnika dochodzi do zainicjowania nowego życia. Powstały organizm przyjmuje materiał genetyczny komórki somatycznej. Kiedy w procesie rozwoju embrionalnego komórka jajowa osiąga stadium blastocysty, wówczas podlega tej samej procedurze pobrania wewnętrznej masy komórkowej. Dawca jądra, będący zarazem biorcą przeszczepu z tak uzyskanych komórek macierzystych, nie wymaga pokonania bariery zgodności tkankowej. Niekiedy w procesie klonowania pro-

ponuje się zastosowanie zwierzęcej komórki jajowej. Po enukleacji jednak wprowadzałoby się jądro komórki somatycznej ludzkiej, przez co embrion zasadniczo nabywałby cechy właściwe dla materiału genetycznego człowieka, ale posiadałby również materiał zwierzęcy w postaci mitochondrialnego DNA. Organizm utworzony w ten sposób miałby charakter chimery ludzko-zwierzęcej.

Negatywnym argumentem etycznym w kwestii klonowania jest wykorzystanie komórki jajowej, a dokładnie ooplazmy (enukleowane komórki jajowej). Posiada ona informacje (dotychczas jeszcze niedokładnie poznane), które są zdolne wspierać rozwój obcego materiału genetycznego wbrew jego somatycznemu zaprogramowaniu. Procesy, jakie zachodzą w pierwszych dniach rozwoju embrionalnego są dla naukowców wciąż wielką tajemnicą. Nowe odkrycia biologii molekularnej, zwłaszcza w kwestii regulacji ekspresji genów przez małe cząsteczki RNA, np. siRNA (ang. *interference RNA*), miRNA (ang. *micro RNA*) otwierają nowe, nieznanne dotąd, wpływy na regulację rozwoju epigenetycznego.

Jajniki podczas życia kobiety uwalniają około 400 komórek jajowych zdolnych do zapłodnienia, jednakże 99,9% spośród około 7 milionów oocytów obecnych w jajnikach obumiera w wyniku apoptozy, większość jeszcze przed urodzeniem. Natura dzięki mechanizmom jeszcze zupełnie nieznanym weryfikuje los komórek jajowych. Stąd też problem pozyskiwania komórek jajowych kobiet do procedury transferu jądra ostatecznie może znaleźć rozwiązania komercyjne, nieobojętne dla zdrowia dawczyni, zwłaszcza ze względu na konieczność hormonalnej stymulacji jajczkowania.

Grupy naukowców pod kierownictwem prof. Yamanaka w Uniwersytecie w Kioto oraz Thomsona i Yu z Uniwersytetu w Wisconsin-Madison, niezależnie wygenerowały pluripotencjalne komórki macierzyste o właściwościach komórek embrionalnych, zwane indukowanymi macierzystymi komórkami pluripotencjalnymi iPS (ang. *induced pluripotent stem cells*). Przy użyciu retrowirusów zastosowano transfer genów odpowiedzialnych za pluripotencję, np. Oct – $\frac{3}{4}$ (ang. *octamer transcription factor*), Sox2, Klf-4, c-myc, nanog, LIN28, do niepluripotencjalnych komórek, takich jak fibroblasty [20-24]. Eksperyment zakończono w 2006 r. na komórkach mysich i w 2007 r. na ludzkich. Odkrycie to niosło wielkie obietnice na rozwój terapii komórkowej, eliminującej problemy etyczne, jak i problem zgodności

tkankowej. Entuzjazm jednak przygasł z uwagi na ryzyko nowotworzenia, jakkolwiek naukowcy nie poddają się i wciąż badania w tej dziedzinie trwają.

Ze stosowaniem pluripotencjalnych komórek macierzystych wiąże się ryzyko powstawania teratom (łac. *teratoma*, *potwór*, *dziwo*), czyli nowotworów wywodzących się od pluripotencjalnych komórek macierzystych? W warunkach *in vivo* status komórki macierzystej jest bardzo dynamiczny. Procesy migracji, mobilizacji i różnicowania komórek macierzystych są zależne od mikrośrodowiska (niszy komórek macierzystych – (ang. *stem cell niche*), w jakim się znajdują [25–27]. Tak więc trudno przewidzieć los komórek macierzystych w warunkach *in vivo*.

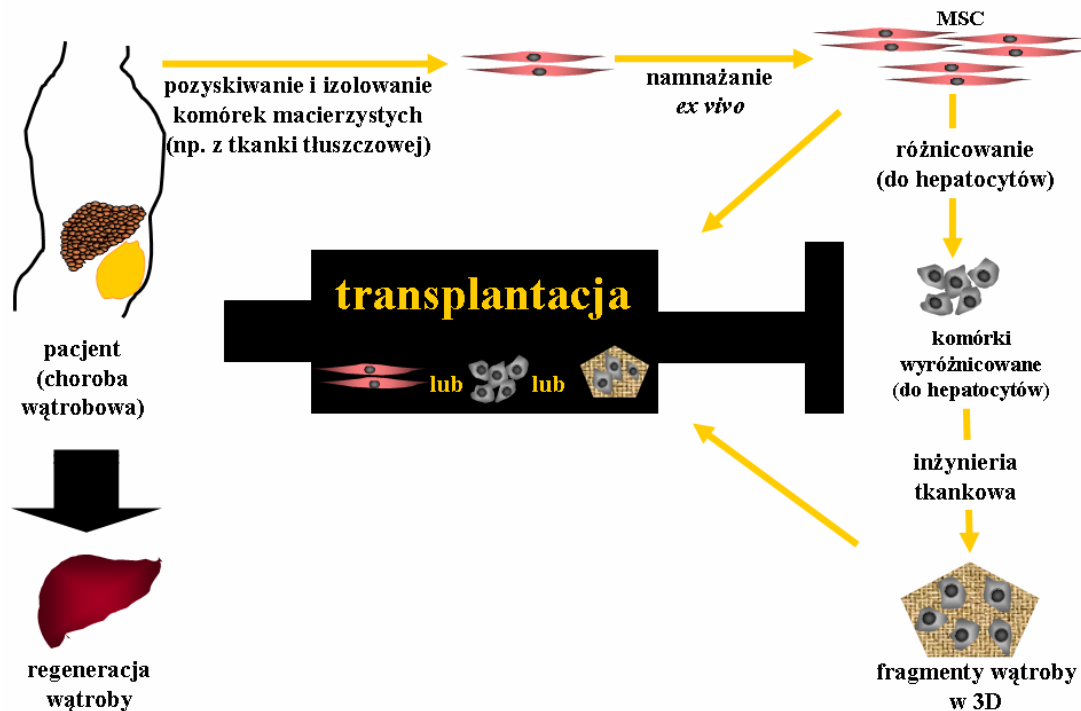
Przytaczając powyższe technologie, pojawiają się istotne pytania: czy człowiek może tak śmiało i bezkarnie ingerować w embrion drugiego człowieka i/lub doprowadzać do jego destrukcji, albo – czy manipulacje genetyczne na poziomie wczesnej embriogenezy nie generują zmian/błędów, które później wpłyną na zdrowie biorcy komórek.

PERSPEKTYWY STOSOWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DOROSŁEGO CZŁOWIEKA (*ADULT STEM CELLS*)

Teoria o istnieniu nerwowych komórek macierzystych w mózgu obaliła dogmat o niemożności odbudowy neuronów. Komórki macierzyste u dorosłego człowieka odkryto w latach 60. Mniej więcej w tym samym czasie pojawiło się kilka rewolucyjnych prac. Pierwszą z nich było odkrycie przez McCullocha i współautorów, samoodnawiających się komórek w mysim szpiku kostnym [28]. Formowały one kolonie w śledzionach naświetlanych myszy po transplantacji. Autorzy wówczas napisali: *Stem Cells are primal cells, common to all multi-cellular organisms that retain the ability to renew themselves through cell division and can differentiate into a wide range of specialized cell types.* („Komórki macierzyste to pierwotne komórki, powszechnie występujące w wielokomórkowych organizmach, które posiadają zdolność do samoodnawiania się oraz różnicowania w szerokie spektrum wyspecjalizowanych komórek”).

Kolejnym odkryciem było odkrycie zjawiska neurogenezy przez Altmana [29]. Zjawisko to zostało zignorowane i dopiero w latach 90. uznane przez lobby naukowe. Postęp w tej dziedzinie jest w ostatnich latach bardzo intensywny. Obecnie wiemy, że w organizmie człowieka jest rezerwuuar komórek macierzystych,

Autologiczna terapia komórkami macierzystymi (Autologous stem cells therapy)



RYC. 4. Schemat przedstawiający zastosowanie autologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) z tkanki tłuszczowej na chorobę wątroby.

Tkankę tłuszczową pobiera się od chorego pacjenta drogą lipoaspiracji lub chirurgicznie. Następnie komórki mezenchymalne (MSC) są izolowane, namnażane i różnicowane w kierunku hepatocytów. Przy wykorzystaniu technik inżynierii tkankowej, hepatocyty są hodowane w trójwymiarowych (ang. *three dimensional 3D*) hodowlach w celu wygenerowania fragmentów tkanki. Następnie implantuje się komórki dawcy z powrotem, ale tym razem do chorego narządu. Implantowane mogą być: 1. komórki mezenchymalne po wyizolowaniu i namnożeniu, 2. hepatocyty wygenerowane z komórek mezenchymalnych, 3. hepatocyty wygenerowane z komórek mezenchymalnych w trójwymiarowych (3D) hodowlach.

odpowiadających za regenerację i regulację homeostazy. Komórki te doprowadzają organizm do odnowy po przebytych chorobach czy traumie. Szpik kostny zawiera co najmniej dwie główne populacje komórek macierzystych: nieadherentne hemopoetyczne komórki macierzyste (ang. *hematopoietic stem cells, HSC*) oraz adherentne mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells, MSC*), inaczej zwane komórkami stromalnymi [6, 7, 30, 31]. Od dawna znamy komórki hemopoetyczne (ang. *hematopoietic stem cells, HSC*) ze szpiku kostnego, które są używane od ponad 40 lat w transplantacji. Sugeruje się, że komórki mezenchymalne wykazują znacznie większy potencjał. Mimo tego, że ich pochodzenie jest mezodermalne, wykazują możliwość różnicowania się w kierunku komórek trzech linii zarodkowych: ektodermy, endodermy i mezodermy [6, 7, 33, 34]. Ta zdolność sugeruje, że mają większy potencjał, niż uprzednio myślnano. Udowodniono, że mogą dać początek, oprócz komórek linii mezodermalnej również neuronom, kar-

diomiocytom lub hepatocytom. Jest to rewolucyjne odkrycie, otwiera bowiem możliwości prawie takie same jak przy zastosowaniu komórek embryonalnych [30–32], aczkolwiek nie wiąże się z degradacją embrionu i problemami natury etycznej.

Komórki mezenchymalne (MSC) zostały zidentyfikowane w większości tkanek ludzkich (szpik kostny, tkanka tłuszczowa, krew pępowinowa, płyn owodniowy, łożysko, serce) [4–12]. Najwięcej badań przeprowadzono na komórkach szpiku kostnego. W ostatnich latach naukowcy odkrywają coraz to nowe subpopulacje niehemopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym o różnym profilu markerów powierzchniowych, np. pluripotencjalne VSEL (ang. *very small embryonic – like stem cells*) odkryte przez grupę pod kierownictwem Ratajczaka [30–32].

Wiele nadziei wiąże się z odkryciem multipotencjalnych MSC w tkance tłuszczowej na początku 2000 r. [8, 35–44]. Zasobność tkanki tłuszczowej w komórki macierzyste jest bardzo duża. Łatwo te komórki pozyskać, wyizolować i na-

mnożyć. Metoda pobrania jest nieinwazyjna, pod lokalnym znieczuleniem i bez uszczerbku na zdrowiu.

Istnieje teoria o hierarchiczności MSC w organizmie człowieka [45, 46]. Teoria ta zakłada, że w organizmie człowieka istnieje pula komórek mezenchymalnych o różnym stopniu ukierunkowania. Komórki te mogą różnić się ekspresją genów i markerów powierzchniowych w zależności od niszy, w jakiej się znajdują. Wiedza ta uświadamia nam, że jedynymi wyzwaniami w pracy nad komórkami macierzystymi dorosłego człowieka jest precyzyjne oznaczenie i scharakteryzowanie poszczególnych subpopulacji, w celu wystandaryzowania metod izolacji, selekcji i hodowli *in vitro*.

Nasuwają się pytania – co stymuluje te komórki do migracji, mobilizacji i różnicowania w miejscu, gdzie jest zapotrzebowanie? Albo, co sprawia, że w jednym organizmie reagują one natychmiast, a w innym nie? Innymi słowy, co wpływa na stan, potencjalność i „kondycję” komórek macierzystych dorosłego człowieka? Na te pytania nie znamy jeszcze odpowiedzi.

Obecnie cała uwaga jest skupiona na zastosowaniu komórek macierzystych dorosłego człowieka w terapii komórkami macierzystymi. Szczególne zainteresowanie jest terapią autologicznymi komórkami macierzystymi (ryc. 4). Komórki macierzyste można uzyskać z krwi pępowinowej, ze szpiku kostnego, albo z tkanki tłuszczowej. Deponowanie krwi pępowinowej podczas porodu w banku krwi pępowinowej jest obecnie powszechnie stosowane. Problem jest jeszcze z ich efektywnym wyizolowaniem z zamrożonej krwi i namnożeniem *in vitro* do wymaganej ilości. Wyizolowane odpowiednie komórki macierzyste wstrzykuje się do miejsca uszkodzenia w czasie rzeczywistym lub po uprzednim namnożeniu i ukierunkowaniu. Badania kliniczne z użyciem autologicznych komórek macierzystych (z różnych źródeł) w terapii na stwardnienie rozsiane, nowotwory mózgu, marskość wątroby, chorobę wątrobową, białaczkę, cukrzycę i inne są w toku [47–52].

Użycie autologicznych komórek macierzystych w terapii eliminuje jakiegokolwiek problemy związane z barierą zgodności tkankowej, jak również problemy etyczne.

Pomimo wielkich nadziei, terapia ta jest obarczona wieloma ograniczeniami. Najważniejsze są ograniczenia dotyczące pobierania i namnażania komórek macierzystych. Niemniej trudne jest zapewnienie przeszczepionym komórkom odpowiedniego mikrośrodowiska w miejscu ich poda-

nia. Środowisko to powinno zapewnić odpowiedni dobór tlenu, substancji odżywczych oraz możliwość różnicowania się w odpowiednią tkankę, ewentualnie możliwość doróżnicowania. Jest to bardzo duże wyzwanie.

Stosowanie matryc tkankowych umożliwia uniknięcie kosztownego i skomplikowanego procesu pozyskiwania i izolacji komórek macierzystych [13, 14]. Uwalniane ze wszczepu cytokiny stanowią sygnał do rekrutacji tych komórek zarówno z otaczających tkanek, jak i krwi krążącej i szpiku. Komórki macierzyste na zasadzie chemotaksji odnajdują „źródło sygnału uszkodzenia”, jakim jest matryca. Osiedlają się w niej i różnicują zgodnie z otrzymanyymi ze środowiska wszczepu sygnałami. Matryce tkankowe mogą być przygotowywane z tkanek ludzkich przez selektywne usunięcie niektórych ich komponentów. Inną metodą jest częściowe lub całkowite zastępowanie macierzy zewnątrzkomórkowej wszczepu białkami odzwierzęcymi (np. kolagen świński, bydłocy lub koński) lub wytworzonymi *in vitro* białkami ludzkimi.

Największe oczekiwania w przypadku zastosowania komórek macierzystych w terapii wiąże się z leczeniem niewydolności mięśnia sercowego, uzupełnianiem neuronów dopaminoergicznych w mózgu i wsparciem dla chorej wątroby. Już od kilku lat stosuje się w USA wykorzystanie autologicznych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ang. *adipose tissue derived stem cells, AT-MSC*) w czasie rzeczywistym u pacjentów po przebytych zawale serca. Specjalnie wyprodukowana aparatura pobiera tkankę tłuszczową od pacjenta po przebytych zawale, przetwarza i izoluje odpowiednią frakcję komórek macierzystych, a następnie wstrzykuje do serca w czasie rzeczywistym. Terapia cieszy się ogromnym zainteresowaniem i obecnie trwają prace nad modyfikacją aparatury i zaadaptowaniem jej do innych poważnych schorzeń, np. choroby wątrobowej. Rycina 4 przedstawia model terapii autologicznymi komórkami z tkanki tłuszczowej w chorobie wątrobowej. Obecnie trwają prace nad wystandaryzowaniem tej metody oraz monitorowaniem skutków.

Odmianą terapii komórkowej z powodzeniem stosowanej w klinice jest stosowanie komórek szpiku do indukcji kościotworzenia. Dodawanie komórek szpiku w miejsce złamania lub wszczepionej matrycy kostnej znacznie przyspiesza proces gojenia tkanki kostnej [53–55].

Przeszczepy tkankowych komórek macierzystych stosowane są również z powodzeniem w

okulistyce w odtwarzaniu uszkodzonego nabłonka rogówki. Fragment rąbka rogówki zdrowego oka, zawierający komórki macierzyste, jest przeszczepiany do chorego oka, gdzie odbudowuje populację komórek macierzystych rąbka. Hodowla komórek macierzystych nabłonka rogówki umożliwia uzyskanie dużej ilości komórek z niewielkiej biopsji [56].

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej fakty i perspektywy zastosowania terapii przy użyciu komórek macierzystych są inspirujące i otwierają nowe nadzieje w medycynie regeneracyjnej. Jednocześnie zastosowanie komórek macierzystych niesie ze sobą niestety również zagrożenia. Multi- lub pluripotencjalne komórki macierzyste dorosłego, zwłaszcza ze źródeł takich jak tkanka tłuszczowa czy krew pępowinowa, które jest łatwo pozyskać w dużej ilości bez uszczerbku na zdrowiu są idealnym narzędziem. Krew pępowinowa i łożysko są zwykle wyrzucane podczas porodu. Rozsądne wydaje się spożytkowanie tak zasobnych źródeł i wykorzystanie ich do terapii. Komórki szpiku kostnego i krwi pępowinowej są najdokładniej przebadane. Już wiadomo, że szpik kostny jest zasobny w pluripotencjalne komórki macierzyste. Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej są również bardzo atrakcyjnym narzędziem do badań i terapii komórkowej, ponieważ można je łatwo pozyskać w dużych ilościach z lokalnym znieczuleniem i bez uszczerbku na zdrowiu dawcy. Komórki macierzyste dorosłego człowieka (w przeciwieństwie do komórek embrionalnych, przez wzgląd na problemy etyczne) są już z sukcesem wykorzystywane w terapiach białaczek, zawałów serca, zwyrodnień układu szkieletowego, czy nowotworach.

Jakkolwiek istnieją również potencjalne zagrożenia, jakie ze sobą niesie terapia komórkami macierzystymi. Stosowanie komórek embrionalnych to dodatkowo problemy etyczne i zamęt natury moralnej w społeczeństwie. Najważniejsze jest bezpieczeństwo stosowania komórek macierzystych. Badania powinny być solidne, rzetelne i powinny być długoterminowo monitorowane. Należy pamiętać, że potencjał komórek macierzystych, który z jednej strony jest taki korzystny i obiecujący (potencjalność, zdolność do samoodnawiania i nieskończonych podziałów), może z drugiej jednak strony przysporzyć poważne problemy w postaci niekontrolowanego rozrostu i różnicowania. Konsekwencją może być nowotwór. Inne negatywne skutki są nam jeszcze nie

znane. Przede wszystkim mowa tutaj o nieznanym dotąd jeszcze obszarze negatywnych efektów ubocznych, które mogą się zmanifestować za kilka lub kilkanaście lat.

Musimy pamiętać, że Natura sama przez się, potrafiła stworzyć Życie z „Jednej Komórki” (zapłodnionej komórki jajowej), jakim jest ludzki organizm i poprzez szereg fenomenalnych procesów i mechanizmów wygenerować tak skomplikowany „Organ”, jakim jest ludzkie ciało. Co więcej, Natura dała temu „Organowi” system immunologiczny, aby walczył z zewnętrznymi czynnikami inwazyjnymi. Tak więc nasze manipulacje na genomie, proteomie czy embrionie, jak również kliniczne zakusy, powinny być niezwykle rozsądne i przemyślane, mając wciąż na uwadze jakiegokolwiek niebezpieczeństwa, błędy i zagrożenia z pochopnego i niepokornego podejścia.

PIŚMIENNICTWO

1. Evans MJ, Kauffman MH.: *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos*, Nature 1981; 292: 154–156.
2. Thomson J.A, Itskovitz J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.: *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*, Science 1998; 282(5391), 1145–1147.
3. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N.: *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*, Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(21), 11307–11312.
4. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH.: *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells 2004;22:1338–1345.
5. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM.: *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*, Blood 2001;98:2396–2402.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al.: *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*, Science 1999;284:143–147.
7. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al.: *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow* 2002 Nature; 418: 41–49.
8. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, et al.: *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell 2002;13:4279–4295
9. De Coppi P, Bartsch GJr, Siddiqui MM et al.: *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol 2006; 25:100–106.
10. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H.: *Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Stem Cells 2004;22:625–634.

11. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. 2004.: *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood 103:1669–1675.
12. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N et al.: *Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow)*. Blood 2007;110:3438–3446.
13. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC, Review: *ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells*. Tissue Eng 2006; 12: 3007–3019.
14. Philip D, Chen SS, Fitzgerald W, Orenstein J, Margolios L, Kleinman HK.: *Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation*, Stem Cells 2005;23:288–296.
15. Semb H.: *Human embryonic stem cells: origin, properties and applications*. APMIS 2005; 113: 743–750.
16. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R.: *Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres*. Nature. 2006 Nov 23;444(7118):481–485.
17. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature 1996; 380: 64–66.
18. Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S.: *Nuclear reprogramming and stem cell creation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003;100 Suppl 1: 11819–11822.
19. Mitalipov S, Wolf D.: *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol 2009;114: 185–199.
20. Takahashi K, Yamanaka S.: *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*, Cell. 2006 Aug 25;126(4):663–76. PMID: 16904174
21. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S.: *Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells*. Nature. 2007 Jul 19;448(7151):313–7. PMID: 17554338
22. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Routhi V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA.: *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science 2007;318:1917–1920.
23. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R.: *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature. 2007; 448:318–24.
24. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K.: *Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution*. Cell Stem Cell. 2007;1:55–70.
25. Jones DL, Wagers AJ.: *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche*. Nature Rev 2008;9:11–21.
26. Adams GB, Martin RP, Alley IR, Chabner KT, Cohen KS, Calvi LM, Kronenberg HM, Scadden DT.: *Therapeutic targeting of a stem cell niche*. Nat Biotechnol 2007;25:238–243.
27. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE.: *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*, Nature 1963; 197:552–454.
28. Altman J, Das G.: *Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig*. Nature 1967: 214, 1098 – 1101.
29. Kucia M, Reza R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ.: *Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells*, Leukemia 2005;19:1118–1127.
30. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M.: *A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues*. Leukemia 2007; 21: 860–867.
31. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. „*Small stem cells*” in adult tissues: very small embryonic – like stem cells stand up!. Cytometry Part A 2009; 75A: 4–13.
32. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, et al.: *Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro*. Exp Neurol 2000;164:247–256.
33. Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F.: *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science 1998;279:1528–1530.
34. Banaś A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T.: *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes*. Hepatology 2007;46:219–228.
35. Banaś A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: Learning from hepatogenic differentiation strategies. Developmental Dynamics 2007;236:3228–3241.
36. Banaś, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. *IFATS Collection: In vivo therapeutic potential of human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells (AT-MSCs) after transplantation into mice with liver injury*. Stem Cells 2008; 26:2705–2712.
37. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS.: *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 2005; 328:258–264.
38. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso ZC, Schreiber RE, Fraser JK, et al. *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells*. Keio J Med 2005;54:132–141.
39. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, Van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, et al.: *Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue*. Exp Cell Res 2005;308:283–290.
40. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE.: *Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun 2002;294:371–379.
41. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC.: *Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 2005;332:370–379.
42. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A et al.: *Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse*. J Exp Med 2005;201:1397–1405.
43. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, et al.: *Adipocyte differentiation*

of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:255–263.

44. Dennis JE, Charbord P.: *Origin and differentiation of human and murine stroma*. *Stem Cells* 2002; 20:100–106.

45. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA.: *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. *Exp Hematol* 1974; 2: 83–92.

46. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al.: *Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use*. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557–564.

47. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al.: *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. *Cell* 2003;114:763–776.

48. Tyndall A, Fassas A, Passweg J, et al.: *Autologous hematopoietic stem cell transplants for autoimmune disease—feasibility and transplant-related mortality*. *Autoimmune Disease and Lymphoma Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, the European League Against Rheumatism and the International Stem Cell Project for Autoimmune Disease*. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24: 729–34.

49. Burt RK, Loh Y, Pearce W, et al.: *Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for non-malignant diseases*. *JAMA* 2008; 299: 925–36.

50. Couri C, et al.: *C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic*

stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2009; 301: 1573–1579.

51. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW: *Hofmann WK and Thiel E. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation*. *N Engl J Med* 2009; 360: 692–698.

52. Richards M. i wsp.: *Marrow – derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction*, *J Orth Res*, 1999; 17: 900–908.

53. Ohgushi H i wsp.: *Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering*, *J Biomed Mater Res*, 1999; 48:913–927.

54. Caplan A.: *The regeneration of skeletal tissues with mesenchymal stem cells*, *Frontiers in Tissue Engineering*, Elsevier Science Ltd., 1998; 471–478.

55. Śladowski D, Liberek I, Lipski K, Ozga T, Olkowska-Truchanowicz J: *Culture of the primary corneal epithelium as a potential component of test batteries for eye irritancy testing* *Szaflik J. Toxicology in vitro* 2005; 19:875–878.

dr Agnieszka Banaś
 Uniwersytet Rzeszowski
 agnieszkabanas@o2.pl
 tel.: 785558321