

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 30, 2003

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

Suplement nr 21

Redaktorzy:

M. Ratajczak, Z. Osuchowska, J. Kawiak

KOMÓRKI MACIERZyste

STEM CELLS

www.pbkom.pl

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

KOMÓRKI MACIERZYTE
STEM CELL

Redaktorzy: Mariusz Ratajczak, Zofia Osuchowska i Jerzy Kawiak



OD REDAKCJI

Obecna Konferencja z zakresu Biologii Komórki jest poświęcona nieembriologicznym komórkom macierzystym, ich przemieszczaniu się i różnicowaniu. Problem ten może być interesujący również jako perspektywa wykorzystania komórek macierzystych w leczeniu.

Niniejszy Suplement oprócz tekstu referatów zawiera również sprawozdania z kilku ośrodków zajmujących się w Kraju problemami wykorzystania komórek macierzystych. Jesteśmy przekonani, że materiał ten będzie interesujący dla Czytelników, dostarcza bowiem dodatkowych informacji.

Tym razem będziemy gośćmi Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Za tę życzliwość dziękujemy.

Redaktorzy

PLASTYCZNOŚĆ NIEEMBRIONALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH: FAKT CZY ARTEFAKT?*

PHENOMENON OF TISSUE-SPECIFIC STEM CELL PLASTICITY

Magdalena KUCIA, Marcin MAJKA, Mariusz Z. RATAJCZAK

Zakład Transplantologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego Collegium Medicum, Kraków-Prokocim

Streszczenie: Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych jest jednym z najbardziej kontrowersyjnych zagadnień współczesnej biologii i medycyny doświadczalnej. Koncepcja, że komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo mogą się odróżnicowywać, dając początek komórkom macierzystym innych tkanek i narządów, stwarza z jednej strony nadzieję na opracowanie nowych strategii terapeutycznych w medycynie regeneracyjnej wykorzystujących te właśnie komórki do leczenia, z drugiej zaś jest ważnym argumentem przyczyniającym się do spowolnienia badań nad wykorzystaniem w podobnym celu komórek embrionalnych. W pracy pokrótce przedstawiony zostanie własny pogląd autorów na zjawisko plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych. Przedstawione zostaną wyniki badań własnych, pokazujących możliwość krążenia komórek macierzystych w ustroju, współzawodniczących o wspólne nisze w tkankach. Fakt, że w tkankach obwodowych mogą znajdować się heterogenne populacje wczesnych macierzystych komórek ukierunkowanych dla różnych tkanek i narządów tłumaczy szereg artefaktów w badaniach, gdzie pokazano tzw. plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych. Komórki ukierunkowane tkankowo, pomimo że nie mają zdolności transróżnicowania w inne komórki macierzyste, są jednak ważnym źródłem dla procesów regeneracyjnych (np. układu krwiotwórczego, naskórka, wątroby). Dlatego też optymalizacja ich izolacji i opracowanie metod ekspansji *ex vivo* w hodowlach jest istotnym wyzwaniem medycyny doświadczalnej.

Słowa kluczowe: LIF, HGF, SDF-1, elastyczność, fuzje komórkowe, izolacja chemotaktyczna, regeneracja.

Summary: It has been suggested that bone marrow (BM)-derived hematopoietic stem cells transdifferentiate into tissue-specific stem cells (the so-called phenomenon of stem cell plasticity), but the possibility of committed tissue-specific stem cells pre-existing in BM has not been given sufficient consideration. We hypothesized that tissue-committed stem cells i) circulate at a low level in the peripheral blood (PB) under normal steady-state conditions, maintaining a pool of stem cells in peripheral tissues, and their levels increase in PB during stress/tissue injury; ii) they could be chemoattracted to the BM where they

*Praca finansowana z grantu KBN PBZ-KBN-083/PO5/2002.

find a supportive environment and that the SDF-1–CXCR4, HGF/SF-c-MET and LIF-LIF R axes play an prominent role in the homing/retention of these cells to BM niches. SDF-1 chemotaxis combined with real-time RT-PCR analysis revealed that i) these early tissue-specific cells reside in normal murine BM, ii) express CXCR4 on their surface and iii) can be enriched (up to 60x) after chemotaxis to an SDF-1, HGF/SF or LIF gradient. These cells were also highly enriched within purified populations of murine Sca-1⁺ BM MNC as well as of human CD34⁺, AC133⁺ and CXCR4-positive cells. We also found that the expression of mRNA for SDF-1, HGF/SF and LIF is upregulated in damaged heart, kidney and liver. Hence our data provide a new perspective on bone marrow not only as a home for hematopoietic stem cells but also a „hideout” for already differentiated tissue-committed stem/progenitor cells that follow an SDF-1, HGF/SF and LIF gradient, could be mobilized into PB, and subsequently take part in organ/tissue regeneration.

Key words: LIF, HGF, SDF-1, plasticity, cell fusion, chemotactic isolation, regeneration.

PLASTYCZNOŚĆ NIEEMBRIONALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH – OBECNY STAN WIEDZY

Komórki embrionalne charakteryzuje plastyczność tzn. możliwość różnicowania się w komórki macierzyste charakterystyczne dla różnych narządów. Nadzieje, że podobną cechą obdarzone mogą być nieembrionalne komórki macierzyste rozbudziły wiele emocji w świecie naukowym. Szereg poważnych pism naukowych zamieściło w ostatnich kilku latach prace pokazujące, że nieembrionalne komórki macierzyste izolowane z tkanek dojrzałych osobników mają ogromne możliwości transróżnicowania się w komórki charakterystyczne dla innych tkanek i narządów. Pokazano np. że macierzyste komórki nerwowe lub komórki macierzyste mięśni szkieletowych mogą się różnicować w kierunku komórek hematopoetycznych [1, 2, 3, 4]. Największą plastyczność i zdolność do transróżnicowania przypisano z kolei krwiotwórczym komórkom macierzystym. Komórki te miały dawać początek komórkom macierzystym mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby, trzustki, tkanki nerwowej oraz nerki [5-14]. Tak więc komórki macierzyste układu krwiotwórczego pochodzącego z mezodermy miały posiadać właściwości transróżnicowania się w komórki macierzyste wywodzące się z innych listków zarodkowych – endodermy (np. hepatocyty) czy też ektodermy (np. neurocyty lub keratynocyty).

Ważną rolę w transróżnicowaniu komórek szpiku przypisano również tzw. mesenchymalnym komórkom macierzystym, oraz zbliżonym do nich tzw. wielopotencjalnym komórkom progenitorowym (ang. *multipotencjal progenitor cells*) [15]. Fakt, że komórki mesenchymalne szpiku kostnego izolowane wraz z komórkami fibroblastoidalnymi podścieliska krwiotwórczego mogą się w pewnych warunkach różnicować w kierunku komórek mięśni gładkich, adipocytów, chondrocytów i osteoblastów nie jest zaskoczeniem [16-18]. Zjawisko to zostało opisane ponad ćwierć wieku temu i komórki te próbowano w ubiegłym stuleciu stosować w leczeniu np. ubytków tkanki kostnej. Pewnego rodzaju niespodzianką było natomiast wykazanie, że komórki te mogą dawać początek hepatocytom, komórkom mięśnia sercowego lub

tkanki nerwowej [17-18, 19–20]. W tych bowiem przypadkach komórki mesenchymalne pochodzące z mezodermy mogły się różnicować w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych (endo- lub ektodermy).

W ślad za optymistycznymi doniesieniami ukazującymi niemal nieograniczoną zdolność do transróżnicowania się komórek macierzystych izolowanych z różnych tkanek w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych pojawiły się sygnały ostrzegawcze. Wiele uprzednio opublikowanych wyników w pismach o tzw. wysokim „*impact factor*” nie można było powtórzyć [21–24]. Zaczęto szukać przyczyn ewentualnych „błędów” lub alternatywnego tłumaczenia obserwowanego zjawiska plastyczności [25]. Obecnie uważa się, że opisywana plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych wynikać może z:

- 1) zdolności komórek macierzystych do fuzji z komórkami zróżnicowanymi [26-27],
- 2) indukowania zmian epigenetycznych w komórkach podczas ich hodowli poza organizmem, które prowadzą do pojawienia się odmiennych tkankowo markerów różnicowania [28] oraz
- 3) obecności heterogennych populacji komórek macierzystych w różnych tkankach.

W dalszej części pracy, w skrócie omówimy powyższe alternatywne wytłumaczenia zjawiska plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych.

FUZJA KOMÓREK – JAKO ALTERNATYWNE WYTŁUMACZENIE ZJAWISKA PLASTYCZNOŚCI KM

Stosunkowo wcześniej jako jedną z przyczyn tłumaczących ewentualne artefakty pokazujące plastyczność – przyjęto fuzję komórek. Fuzja komórek polega na połączeniu się dwóch różnych komórek w jedną nową komórkę będącą hybrydą genotypową i fenotypową komórek wyjściowych. Zjawisko fuzji komórek jest zjawiskiem niezwykle rzadkim, lecz znanym dobrze od dawna w biologii doświadczalnej. Aby zwiększyć częstość jego występowania np. podczas tworzenia komórek hybrydomy – stosowane są specjalne strategie zwiększające zdolność błon do fuzji (np. glikol polietylenowy lub wirus Sendai). Występowanie fuzji komórek embrionalnych ze zróżnicowanymi komórkami, prowadzące do pojawienia się komórek mających nowe markery różnicowania zostało przyjęte szybko jako „wygodne wytłumaczenie” ewentualnych artefaktów w doświadczeniach nad transróżnicowaniem się komórek macierzystych. Zdaniem autorów jest to jednak zjawisko zbyt rzadkie, aby przypisywać mu większe znaczenie biologiczne *in vivo*. Jeżeli zjawisko to ma miejsce, to głównie w warunkach hodowli *in vitro* i nie może tłumaczyć w pełni uzyskanych poprzednio wyników, wskazujących na istnienie plastyczności macierzystych komórek nieembrionalnych [29].

ZMIANY EPIGENETYCZNE W KOMÓRKACH HODOWANYCH POZA ORGANIZMEM

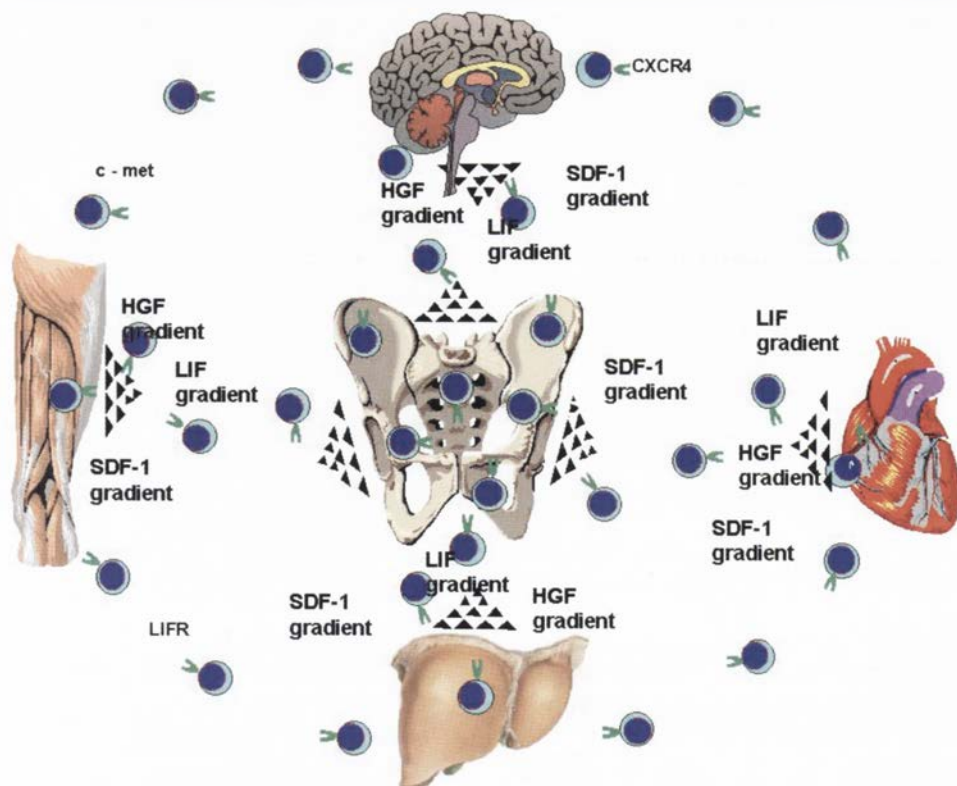
Komórki hodowane poza ustrojem, *in vitro*, znajdują się w warunkach, które zdecydowanie odbiegają od warunków panujących w organizmie, *in vivo*. Mogą więc podlegać zmianom epigenetycznym uwarunkowanym przez mikrośrodowisko hodowli [27, 28]. Spośród najważniejszych czynników, które mogą prowadzić do zmian epigenetycznych w hodowanych komórkach warto wymienić niefizjologiczne stężenie czynników wzrostowych, obecność obcogatunkowej surowicy, plastikowe podłoże naczynia hodowlanego, zaburzona homeostaza znajdujących się w hodowli komórek, powtarzane zabiegi pasażowania komórek itp. Zmianom tym znacznie łatwiej ulegają prawidłowe, wczesne, niezróżnicowane komórki. W tak odbiegających od normy warunkach, w komórkach tych mogą pojawić się markery charakterystyczne dla innych linii komórkowych. Przypuszcza się, że wynikiem takich zmian są m.in. uzyskiwane w wyniku wielokrotnych pasażów tzw. wielopotencjalne komórki progenitorowe pochodzenia mesenchymalnego.

Zmiany epigenetyczne obserwowane w warunkach hodowlanych są w pewnym stopniu zbliżone do zmian indukowanych w prawidłowych komórkach w organizmie przez przewlekłe czynniki zapalne (np. w metaplazjach nabłonka szyjki macicy, nabłonka oddechowego lub wpuustu przetyku oraz rogowaceni błon śluzowych).

PLASTYCZNOŚĆ KOMÓREK DOJRZAŁYCH SSAKÓW JAKO WYNIK OBECNOŚCI HETEROGENNYCH POPULACJI KOMÓREK MACIERZYSTYCH W TKANKACH

Wyniki badań naszego zespołu wskazują na to, że występowanie heterogennej populacji komórek macierzystych w tkankach obwodowych jest najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem obserwowanego „zjawiska plastyczności” nieembrionalnych komórek macierzystych. Występowanie tych komórek w różnych tkankach wynika z ich zdolności do krążenia w ustroju oraz współzawodniczenia/konkurowania o nisze narządowe [32].

Zakładamy, że jedną z właściwości nieembrionalnych komórek macierzystych jest ich pewna zdolność do krążenia w ustroju i tkankach (ryc. 1). Zgodnie z przedstawionym schematem komórki swoiste tkankowo krążą w krwi obwodowej w celu utrzymania w równowadze ich puli w różnych obszarach anatomicznych tej samej tkanki (np. różnych obszarach szpiku kostnego lub tkanki mięśniowej). Najbardziej widoczne jest to dla krwiotwórczych komórek hematopoetycznych i progenitorowych komórek endotelialnych. Liczbę tych komórek można zwiększyć w warunkach tzw. mobilizacji farmakologicznej, co wykorzystuje się obecnie w hematologii klinicznej, podczas pozyskiwania krwiotwórczych komórek macierzystych do przeszczepów krwiotwórczych [33].



RYCINA 1. Postulowana przez nas teoria krążenia zróżnicowanych tkankowo komórek macierzystych w ustroju. Szpik kostny pełni w proponowanym modelu kluczową rolę jako narząd, w którym te komórki mogą czasowo się znajdować i z którego mogą być mobilizowane do krwi obwodowej w sytuacjach stresu i uszkodzenia narządów

Wyniki badań własnych wskazują, że oprócz krwiotwórczych komórek macierzystych, również komórki macierzyste swoiste np. dla mięśni szkieletowych, tkanki nerwowej, wątroby oraz mięśnia sercowego mogą pojawić się w krwi obwodowej. Zjawisko to, jak wykazaliśmy, występuje np. podczas stresu związanego z uszkodzeniem tkanek i narządów (zawału mięśnia sercowego, toksycznego uszkodzenia wątroby lub mięśni) [34]. Uważamy, że mobilizowane stresem urazowym, z niszy tkankowych do krwi obwodowej, komórki macierzyste mogą odgrywać ważną rolę w procesach regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów [34–35].

Zakładamy, że krążące w warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste mogą współzawodniczyć o nisze tkankowe znajdujące się w tkankach i narządach. Nisze takie wydzielają chemoatraktanty przyciągające krążące komórki, zachowując przy tym pewną selektywność dla komórek swoistych danej tkanki. Ponieważ szereg tych chemoatraktantów wykazuje szerokie spektrum działania istnieje możliwość, że nisze tkankowe mogą zawierać pewną domieszkę komórek macierzystych dla innych tkanek.

Tak np. jak wykazaliśmy ostatnio krążące komórki macierzyste układu krwiotwórczego mogą „osiedlać się” w tkance mięśniowej a komórki macierzyste układu mięśniowego mogą „pojawić się” w szpiku kostnym [32]. Fakt ten tłumaczy dlaczego możliwy jest wzrost kolonii hematopoetycznych z izolowanych komórek mięśni i odwrotnie, dlaczego z komórek szpiku mogą wyrastać komórki mięśni szkieletowych. Tak więc za zjawisko to nie odpowiada ani „plastyczność” ani „transróżnicowanie” komórek macierzystych lecz fakt występowania heterogennej populacji komórek macierzystych w tkankach (hematopoetycznych w mięśniach i mięśniowych w szpiku kostnym) [32–34].

Rycina 1 pokazuje główne założenia „teorii krążenia komórek macierzystych i ich konkurencji o nisze tkankowe”. Zakładamy, że szpik kostny zajmuje tutaj ważne i eksponowane miejsce. Rozbudowany układ naczyński szpiku kostnego, jak i fakt wydzielania szeregu chemoatraktantów oraz czynników wzrostowych przez komórki podścieliska szpiku kostnego powodują, że krążące ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste znajdują tutaj sprzyjające warunki do osiedlenia i przeżycia. Tak więc uwzględniając powyższe założenia szpik kostny jest nie tylko „domem” komórek macierzystych układu krwiotwórczego, ale dodatkowo „domem lub przystanią” dla krążących w ustroju ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych (np. mięśni, tkanki nerwowej, wątroby lub nabłonka kanalików nerkowych).

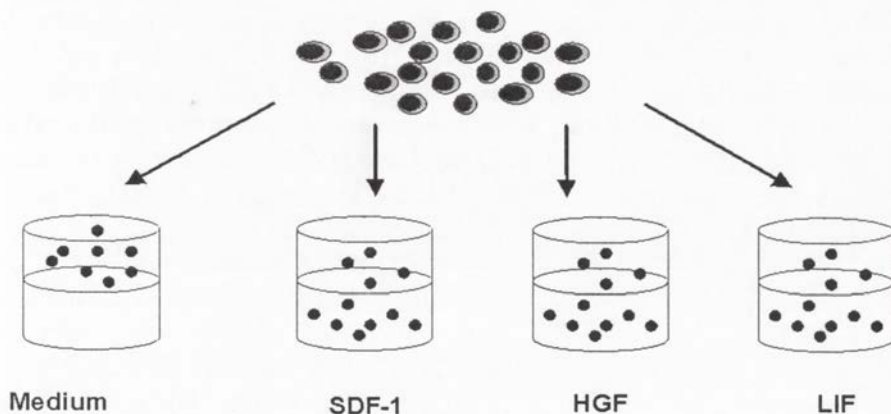
WCZESNE KOMÓRKI UKIERUNKOWANE TKANKOWO MOŻNA WYZOŁOWAĆ ZE SZPIKU KOSTNEGO ZA POMOCĄ GRADIENTU CHEMOTAKSJI

Teoria zaproponowana na rycinie 1 wymagała potwierdzenia doświadczalnego, pokazującego, iż ukierunkowane tkankowo komórki faktycznie znajdują się w szpiku kostnym. Przedstawienie takiego dowodu nie jest możliwe przy użyciu tradycyjnych metod doświadczalnych. Jak wiadomo brak jest specyficznych markerów powierzchniowych występujących na poszczególnych rodzajach ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych. Znacznie to utrudnia wykazanie obecności tych komórek w szpiku kostnym za pomocą bezpośredniej analizy cytochemicznej lub immunofluorescencyjnej przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych. Podobnie pokazanie, że komórki takie będą proliferowały w hodowlach i tworzyły komórki mięśniowe lub nerwowe mogłoby się spotkać z zarzutem, że komórki te pojawiły się w wyniku transróżnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych.

W związku z powyższym zespół nasz posłużył się stosunkowo prostym testem chemotaksji. Założono, że skoro w szpiku kostnym występują wczesne komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo, to powinny one wykazywać chemotaksję do ważnych czynników/chemoatraktantów regulujących ich migrację podczas embriogenezy. W przeprowadzonych badaniach posłużyliśmy się więc strategią separacji chemotaktycznej komórek szpiku (rycina 2) do trzech ważnych czynników o charakterze motomorfogenów, jakimi są:

Izolacja chemotaktyczna

Izolacja komórek jednojądrowych ze szpiku kostnego



**Komórki znajdujące się w dolnych komorach:
RT-PCR w czasie rzeczywistym
Badania histochemiczne**

RYCINA 2. Zastosowana przez nas oryginalna strategia tzw. „izolacji chemotaktycznej”. Izolowane ze szpiku kostnego komórki jednojądrowe nakładane są do górnej komory transwelu i ekspozowane na gradient kluczowych czynników chemotaktycznych/motomorfogenów, które biorą udział w organogenezie (SDF-1, HGF/SF lub LIF). Komórki, które wykazują chemotaksję, są następnie izolowane z dolnej komory transwelu i badane na obecność markerów dla komórek macierzystych poszczególnych tkanek/narządów (mięśnie szkieletowe, wątroba ośrodkowy układ nerwowy, mięsień sercowy)

- 1) stromalny czynnik wzrostowy -1 (ang. *Stromal derived factor-1* – SDF-1),
- 2) czynnik rozproszenia lub tzw. czynnik wzrostowy hepatocytów (ang. *scatter factor/hepatocyte growth factor* – SF/HGF) oraz
- 3) białaczkowy czynnik hamujący (ang. *leukemia inhibitory factor* – LIF).

Dobór powyższych czynników był podyktowany obserwacjami, że te ostatnie pełnią istotną rolę w ontogenezie m.in. układu krwiotwórczego, mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego oraz wątroby – regulując migrację komórek macierzystych odpowiedzialnych za tworzenie tych narządów [36–46].

Rycina 2 odzwierciedla przyjętą strategię doświadczalną. Komórki jednojądrowe izolowane świeżo ze szpiku kostnego były nakładane do górnych komór transwelów oddzielonych od dolnych komór membraną syntetyczną zawierającą pory o średnicy 5 mikrometrów [47–48]. W dolnych komorach umieszczono samo medium (kontrola) lub medium zawierające jeden z chemoatraktantów (SDF-1, SF/HGF lub LIF). Po 5 godzinach chemotaksji z komórek znajdujących się w dolnych komorach izolowano mRNA i przepisano go za pomocą odwrotnej transkryptazy na cDNA. Następnie

za pomocą techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym porównywano ekspresję wczesnych genów charakterystycznych dla wczesnych komórek macierzystych – pomiędzy komórkami wykazującymi chemotaksję do SDF-1, SF/HGF lub LIF a komórkami, które znajdowały się w populacji wyjściowej – jednojądrowymi komórkami szpiku kostnego [49].

Stwierdziliśmy, że komórki wykazujące chemotaksję do SDF-1, SF/HGF i LIF były wzbogacone w komórki wykazujące ekspresję wczesnych markerów mięśni szkieletowych (Myf-5, MyoD, myogenina), mięśnia sercowego (Nrx2.5/Csx, GATA-4), wątroby (α -fetoproteina, CK19), nerwowych (nestyna, GFAP) oraz endotelialnych (KDR, von Willebrand). W tabeli 1 przedstawiono, że wczesne komórki układu mięśniowego były głównie przyciągane przez SDF-1 i HGF, wczesne komórki układu nerwowego przez SDF oraz LIF, a wczesne komórki wątroby przez wszystkie trzy badane czynniki.

Ta stosunkowo prosta strategia doświadczalna wykazała, że w szpiku kostnym znajduje się populacja małych, nieprzylegających, mających zdolność chemotaksji komórek charakteryzujących się ekspresją genów właściwych komórkom macierzystym różnych tkanek/narządów. Ponieważ komórki te odpowiadały chemotaktycznie do gradientu SDF-1, SF/HGF i LIF, muszą mieć zdolność ekspresji swoistych receptorów powierzchniowych, takich jak: CXCR4, c-MET i LIF-R.

Z dalszych badań wykonanych na ludzkim szpiku kostnym stwierdziliśmy, że ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste wzbogacone są w sortowanych za pomocą cytometru przepływowego frakcjach komórek szpiku wykazujących ekspresję antygenów CD34, AC133 i c-Kit-R [50–52]. Ta ostatnia obserwacja wskazuje, że

TABELA 1. Ocena ekspresji mRNA dla wczesnych komórek mięśniowych, nerwowych i wątrobowych w komórkach jednojądrowych izolowanych ze szpiku za pomocą gradientu chemotaktycznego do SDF-1, HGF/SF lub LIF (stopień wzbogacenia w komórkach wykazujących chemotaksję w porównaniu z komórkami wyjściowymi \pm SD)

Czynnik użyty do chemotaksji		Stopień wzbogacenia \pm SD		
		SDF-1	HGF/SF	LIF
Markery mięśniowe	Myf5	88,58 \pm 3,31	3,96 \pm 1,14	34,98 \pm 1,26
	MyoD	176,65 \pm 4,32	9,05 \pm 2,11	31,84 \pm 4,85
	Myogenina	153,85 \pm 8,11	89,39 \pm 3,65	32,37 \pm 1,01
Markery nerwowe	GFAP	93,42 \pm 6,12	3,83 \pm 0,24	35,93 \pm 0,07
	Nestyna	39,56 \pm 3,81	3,83 \pm 0,07	29,03 \pm 0,21
Markery wątrobowe	α -Fetoproteina	11,09 \pm 2,28	10,04 \pm 1,14	67,90 \pm 0,02
	CK19	64,22 \pm 4,02	51,55 \pm 3,25	47,15 \pm 8,66

antygeny CD34 i AC133 nie są swoiste wyłącznie dla komórek macierzystych układu krwiotwórczego, ale mogą się znajdować również na innych tkankowo ukierunkowanych komórkach macierzystych. Tłumaczy to między innymi, dlaczego komórki CD34⁺ szpiku kostnego mają pewną zdolność do regeneracji np. mięśnia sercowego [53–56]. Zdolność ta jednak, jak uważamy, nie jest wynikiem transróżnicowania się komórek macierzystych hematopoetycznych CD34⁺ w komórki mięśnia sercowego, lecz wynikiem występowania w szpiku kostnym komórek macierzystych mięśnia sercowego, które jednocześnie mają antygen CD34. Jest to kolejny przykład, jak błędnie można interpretować zjawisko regeneracji mięśnia sercowego bez brania pod uwagę alternatywnych do transróżnicowania możliwości pochodzenia komórek biorących udział w regeneracji.

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Przyjęta przez nas strategia izolacji chemotaktycznej komórek szpiku kostnego do gradientu kluczowych motomorfogenów wykazała, że szpik kostny zawiera heterogenne populacje swoistych tkankowo komórek macierzystych. To nowe spojrzenie na szpik kostny jako „dom” heterogennych komórek macierzystych ma ważne implikacje terapeutyczne. Ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego mogą bowiem znaleźć ważne zastosowanie w regeneracji narządów i tkanek. Z badań naszych wynika, że komórki te występują w normalnym szpiku kostnym oraz mogą ulegać mobilizacji do krwi obwodowej. Tak więc tzw. „mobilizowana” krew obwodowa może stać się ważnym źródłem nie tylko komórek hematopoetycznych, lecz również innych, ukierunkowanych tkankowo komórek do terapii w medycynie regeneracyjnej. Zespół nasz obecnie opracowuje różne strategie optymalizacji mobilizacji tych komórek.

Zdajemy sobie jednak sprawę, że wykazanie w szpiku kostnym obecności heterogennej populacji komórek macierzystych wymaga dalszych wyjaśnień. Po pierwsze, nie wiemy, czy komórki te dostają się do szpiku z tkanek obwodowych poprzez układ krążenia czy mogą też powstawać *in situ* w szpiku kostnym z wczesnej, hipotetycznej komórki macierzystej, wspólnej np. dla układu krwiotwórczego i innych tkanek. Po drugie, nie wiemy, jaki jest los komórek ukierunkowanych tkankowo po ich osiedleniu się w szpiku. Dalej nie wiemy, czy mogą one się tam samoodnawiać, czy znajdują się tam tylko czasowo. Nie wiemy w końcu, jak długo mogą one przebywać w szpiku kostnym, zachowując potencjał do samoodnawiania i różnicowania. Doświadczenia prowadzone w naszym laboratorium przyniosą wkrótce odpowiedź na postawione pytania.

Istnieje również możliwość, że komórki macierzyste na wczesnym stopniu różnicowania mogą odznaczać się ekspresją genów charakterystycznych dla różnych

tkanek. Geny takie mogłyby wybiórczo zostać zablokowane podczas ich różnicowania się w ukierunkowane liniowo komórki. Ta ostatnia możliwość wydaje się jednak mało prawdopodobna ze względu na fakt, że badania za pomocą tzw. *microarrays* – profilu genów w izolowanych hematopoetycznych komórkach macierzystych nie wykazały ekspresji genów, które są charakterystyczne dla różnicujących się komórek macierzystych innych tkanek (np. Myf5 lub nestyna). Tak więc mamy do czynienia prawdopodobnie z heterogennymi populacjami komórek macierzystych.

PRZYSZŁOŚĆ MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ

Zakładamy, że obserwowana plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych jest zjawiskiem niezwykle rzadkim biologicznie oraz szereg dotychczasowych wyników wynikało z artefaktów związanych z obecnością heterogennych populacji komórek macierzystych w tkankach. W związku z powyższym należy rozpatrzyć alternatywną opcję wykorzystania w medycynie regeneracyjnej embrionalnych komórek macierzystych. Zastosowanie kliniczne tych ostatnich budzi jednak często szereg niepotrzebnych emocji i sprzeciwów natury etycznej. Wiele tych sporów wynika z błędnej interpretacji i niezrozumienia założeń takiej strategii leczniczej. Uważamy, że dialog nad wykorzystaniem komórek embrionalnych np. w celu klonowania terapeutycznego powinien zostać jak najszybciej podjęty przez różne środowiska opiniotwórcze. Poszukiwanie kompromisu w tej sprawie jest nakazem rozwijających się technik biotechnologicznych. Od tematu tego nie da się uciec, można go co najwyżej odwlec na pewien czas. Ucieczka od konstruktywnej dyskusji nad wykorzystaniem tych komórek w medycynie odbywa się ze szkodą dla przyszłych pokoleń, które będą oczekiwać nowych metod leczniczych. Nie ulega wątpliwości, że klonowanie terapeutyczne poprzez transfer jąder komórkowych stworzyło poważne nadzieje na dokonanie się przewrotu w medycynie regeneracyjnej i transplantologii. Szansę tę należy jak najszybciej wykorzystać.

LITERATURA

- [1] SHIH CC, DIGIUSTO D, MAMELAK A, LEBON T, FORMAN SJ. Hematopoietic potential of neural stem cells: plasticity versus heterogeneity. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 2263–2268.
- [2] GEIGER H, TRUE JM, GRIMES B, CARROLL EJ, FLEISCHMAN RA, VAN ZANT G Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. *Blood* 2002; **100**: 721–723.
- [3] KAWADA H, OGAWA M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; **98**:2008–2013.
- [4] ASAKURA A, KOMAKI M, RUDNICKI M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; **68**: 245–253.
- [5] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; **7** (3 Suppl): 86–88.

- [6] LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate stem cells to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; **111**: 589–601.
- [7] CORTI S, STRAZZER S, DEL BO R, SALANI S, BOSSOLASCO P, FORTUNATO F, LOCATELLI F, SOLIGO D, MOGGIO M, CISCATO P, PRELLE A, BORSOTTI C, BRESOLIN N, SCARLATO G, COMI GP. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse. *Exp Cell Res* 2002; **277**: 74–85.
- [8] SANCHEZ-RAMOS JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 880–893.
- [9] PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168–1170.
- [10] IANUS A, HOLZ GG, THEISE ND, HUSSAIN MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; **111**: 843–850.
- [11] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN R, ESTROV Z. Hepatocyte and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [12] HAO HN, ZHAO J, THOMAS RL, PARKER GC, LYMAN WD. Fetal human hematopoietic cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes *in vitro*. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 23–32.
- [13] STAMM C, WESTPHAL B, KLEINE HD, PETZSCH M, KITTER C, KLINGE H, SCHUMICHEN C, NIENABER CA, FREUND M, STEINHOFF G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet* 2003; **361**: 45–46.
- [14] LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1188–1199.
- [15] JIANG Y, VAESSEN B, LENVIK T, BLACKSTAD M, REYES M, VERFAILLIE CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; **30**: 896–904.
- [16] CAPLICE NM, BUNCH TJ, STALBOERGER PG, WANG SW, SIMPLER D, MILLER DV, RUSSELL SJ, LITZOW MR, EDWARDS WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4754–4759.
- [17] QI H, AGUIAR DJ, WILLIAMS SM, LA PEAN A, PAN W, VERFAILLIE CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 3305–3310.
- [18] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.
- [19] SCHWARTZ RE, REYES M, KOODIE L, JIANG Y, BLACKSTAD M, LUND T, LENVIK T, JOHNSON S, HU WS, VERFAILLIE CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1291–1302.
- [20] VOGEL W, GRUNEBACH F, MESSAM CA, KANZ L, BRUGGER W, BUHRING HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003; **88**: 126–133.
- [21] LEMISCHKA IA. Few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 2002; **30**: 848–852.
- [22] HOLDEN C, VOGEL G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science* 2002; **296**: 2126–2129.
- [23] CASTRO RF, JACKSON KA, GOODELL MA, ROBERTSON CS, LIU H, SHINE HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 2002; **297**: 1299.
- [24] MCKINNEY-FREEMAN SL, JACKSON KA, CAMARGO FD, FERRARI G, MAVILIO F, GOODELL MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 1341–1346.
- [25] LIU Y, RAO MS. Transdifferentiation – fact or artifact. *J Cell Biochem* 2003; **1**: 29–40.
- [26] TERADA N, HAMAZAKI T, OKA OM, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER ME, MOREL L, PETERSON BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**: 542–545.

- [27] YING QI, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; **416**: 545–548.
- [28] MORSHEAD CM, BENVENITE P, ISCOVE NN, VAN DER KOOY D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine* 2002; **8**: 268–273.
- [29] WANG X, WILLENBRING H, AKKARI Y, TORIARU Y, FOSTER, AL-DHALIMY M, LAGASSE E, FINEGOLD M, OLSON S, GROMPE M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; March: 1–4 (advance online publication).
- [30] OGURA A, INOUE K, OGONUKU N, LEE J, KOHDA T, ISHINO F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 397–405.
- [31] JAENISCH R, EGGAN K, HUMPHERYS D, RIDEOUT W, HOCHEDLINGER K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 389–396.
- [32] RATAJCZAK MZ, MAJKA M, KUCIA M, DRUKALA J, PIETRZKOWSKI Z, PEIPER S, JANOWSKA-WIECZOREK A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003; **21**:363–371.
- [33] PITUCH-NOWOROLSKA A, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, BAJ-KRZYWORZEKA A, URBANOWICZ B, MALEC E, RATAJCZAK MZ. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cells plasticity. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 13–21.
- [34] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells „hide out” in the bone marrow. *Leukemia* (przyjeta do druku).
- [35] HATCH H, ZHENG D, JORGENSEN ML, PETERSEN BE. SDF-1 α /CXCR4: A mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 339–351.
- [36] ZOU Y, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; **393**:595–599.
- [37] LAZARINI F, THAM TN, CASANOVA P, ARENZANA-SEISDEDOS F, DUBOIS-DALCQ M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 2003 ; **42**: 139–148.
- [38] DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, KÖPRUNNER M, DÖRRIES J, MEYER D, ESGUERRA CV, LEUNG T, RAZ E Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002; **111**: 647–659.
- [39] REISS K, MENTLEIN R, SIEVERS J, HARTMANN D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 2002; **115**: 295–305.
- [40] CRANE IJ, WALLACE CA, MCKILLOP-SMITH S, FORRESTER JV. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 α . *J Immunol* 2000; **165**: 4372–4378.
- [41] BAJETTO A, BONAVIA R, BARBERO S, PICCIOLI P, COSTA A, FLORIO T, DSCHETTINI G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* 1999; **73**: 2348–2357.
- [42] MAINA F, KLEIN R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nature Neuroscience* 1999; **2**: 213–217.
- [43] WEIMAR IS, MIRANDA N, MULLER EJ, HEKMAN A, KERST JM, DE GAST GC, GERRITSEN WR. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34⁺). *Exp Hematol* 1998; **26**: 885–894.
- [44] BIRCHMEIER C, GHERARDI E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in Cell Biology* 1998; **8**: 404–410.
- [45] HATTA T, MORIYAMA K, NAKASHIMA K, TAGA T, OTANI H. The role of gp130 in cerebral cortical development: *in vivo* functional analysis in a mouse exo utero system. *J Neurosci* 2002; **22**: 5516–5524.
- [46] HILTON J. LIF: lots of interesting functions. *TIBS* 1992; **2**: 72–76.

- [47] LIBURA J, DRUKAŁA J, MAJKA M, TOMEASCU O, NAVENOT JM, KUCIA M, MARQUEZ L, PEIPER SC, BARR FG, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis and adhesion. *Blood* 2002; **100**: 2597–2606.
- [48] RECA R, MASTELLOS D, MAJKA M, MARQUEZ L, RATAJCZAK J, FRANCHINI S, GLODEK A, HONCZARENKO M, SPRUCE LA, JANOWSKA-WIECZOREK A, LAMBRIS JD, RATAJCZAK MZ. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* 2003 May 15; **101**: 3784–3793.
- [49] JANKOWSKI K, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RECA R, DONGLING ZHAO, TRZYNA E, ZEMBALA M, RATAJCZAK J, HOUGHTON P, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Both HGF and SDF-1 regulate the metastatic behavior of human Rhabdomyosarcoma Cells, but only HGF enhances their resistance to radio-chemotherapy. *Cancer Research* 2003 (przyjeta do druku).
- [50] GALLACHER L, MURDOCH B, WU DM, KARANU FN, KEENEY M, BHATIA M. Isolation and characterization of human CD34⁺ Lin⁻ and CD34⁺ Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; **95**: 2813–2820.
- [51] CORBEIL D, ROPER K, HELLWIG A, TAVIAN M, MIRAGLIA S, WATT SM, SIMMONS PJ, PE-AULT B, BUCK DW, HUTTNER WB. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5512–5520.
- [52] LEVESQUE JP, HENDY J, WINKLER IG, TAKAMATSU Y, SIMMONS PJ. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2003; **31**: 109–117.
- [53] JANKOWSKI RJ, DEASY BM, CAO B, GATES C, HUARD J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J Cell Science* 2002; **115**: 4361–4374.
- [54] TORRENTE Y, TREMBLAY JP, PISATI F, BELICCHI M, ROSSI B, SIRONI M, FORTUNATO F, EL FAHIME M, D'ANGELO MG, CARON NJ, COSTANTIN G, PAULIN D, SCARLATO G, BRESOLIN N. Intraarterial injection of muscle-derived CD34⁺ Sca-1⁺ stem cells restored dystrophin in *mdx* mice. *JCB* 2001; **152**: 335–348.
- [55] BADORFF C, BRANDES RP, POPP R, RUPP S, URBICH C, AICHER A, FLEMING I, BUSSE R, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; **107**: 1024–1032.
- [56] JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSHI KK, GOODELL MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1355–1356.

Adres autora: ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków
gmagda200@hotmail.com.pl

PRÓBA IZOLACJI LUDZKICH KOMÓREK MACIERZYSTYCH MIĘŚNI SZKIELETOWYCH*

ISOLATION OF HUMAN SKELETAL MUSCLE STEM CELLS

Marcin MAJKA, Anna MICHAŁOWSKA, Magdalena KUCIA,
Mariusz Z. RATAJCZAK

Zakład Transplantologii, Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Zespół nasz wykazał, że wczesne komórki mięśni szkieletowych (komórki satelitarne) mają na powierzchni ekspresję receptora CXCR4. Stwierdziliśmy również, że izolowane z mięśni szkieletowych za pomocą kolejnych pasaży i sortera komórkowego komórki mające ekspresję CXCR4 tworzą w hodowlach *in vitro* charakterystyczne miotuby. Uważamy więc, że komórki te mogą zostać wykorzystane w procesach regeneracji tkanki mięśniowej. Prowadzone w chwili obecnej badania mają na celu optymalizację metody ich izolacji do celów klinicznych.

Słowa kluczowe: komórki satelitarne, izolacja, plastyczność komórkowa, CXCR4, SDF-1, regeneracja.

Summary: We have shown that early muscles precursors cells (satellite cells) express on their surface CXCR4 receptor. These cells isolated by preplating method combine with cell sorting of CXCR4 positive cells, in *in vitro* cultures form characteristic for skeletal muscle myotubes. We believe that these cells could be use in the future in regeneration of muscle tissues. Right now we carry on experiments to develop the isolation strategy for clinical use.

Key words: satellite cells, isolation, cell plasticity, CXCR4, SDF-1, regeneration.

WSTĘP

Przez wiele lat sądzono, że mięśnie szkieletowe oraz mięsień sercowy dojrzałych już osobników nie zawierają komórek macierzystych, które umożliwiałyby ich regenerację w życiu pozapłodowym. Pierwsze doniesienia na temat istnienia komórek

*Praca finansowana przez grant KBN PBZ-KBN-083/P05/2002.

macierzystych mięśni szkieletowych pojawiły się w 1961 z chwilą, gdy komórki te wykryto w mięśniach żab na podstawie morfologii i lokalizacji w stosunku do włókien mięśniowych [22, 27]. Następnie te same komórki opisano w mięśniach ptaków i ssaków [3, 22, 27]. Ze zdjęć wykonanych w mikroskopie elektronowym wynika, że są to małe, jednojądrowe komórki znajdujące się między błoną podstawną a sarkolemmą. Ze względu na ich lokalizację i wygląd nazwane zostały komórkami satelitarnymi. Od tego czasu nastąpił wielki postęp w badaniach nad ich biologią. Szczególnie dużą rolę w ich poznaniu miały doświadczenia prowadzone na zwierzętach z mutacjami wywołującymi objawy podobne do dystrofii mięśniowych u ludzi, a także u myszy „knock-out” nie mających genów odpowiedzialnych za rozwój i dojrzewanie komórek mięśniowych [4, 5, 13, 22, 23, 24]. Uważa się, że komórki satelitarne mięśni szkieletowych biorą udział w ich regeneracji i odnowie po intensywnym wysiłku fizycznym, a także po uszkodzeniu tkanki mięśniowej [3, 22, 27].

Podobnie jak w przypadku mięśni szkieletowych wykazano, że mięsień sercowy ma również populację komórek macierzystych. Komórki te ulegają samoodnowie i różnicowaniu w komórki mięśnia sercowego podczas całego życia danego osobnika – utrzymując tym w równowadze masę mięśniową serca. Mogą one również proliferować podczas przerostu tkanki mięśniowej. Zjawisko takie wykazano ostatnio w preparatach uzyskanych z lewej komory serca u pacjentów ze stenozą aortalną [26].

POTENCJALNE WYKORZYSTANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH MIĘŚNIOWYCH W MEDYCYNIE

Uważa się więc, że w mięśniu sercowym i w mięśniach szkieletowych istnieje pula komórek macierzystych/satelitarnych, które mogą brać udział w procesach regeneracji mięśni zarówno w stanach fizjologicznych (zastępowanie starzejących się i ulegających apoptozie komórek), jak i w stanach patologicznych (zawał mięśnia sercowego, dystrofia mięśniowa) [2, 11, 18].

Udział komórek macierzystych w regeneracji mięśnia sercowego w przeciwieństwie do regeneracji mięśni szkieletowych jest jednak niedostateczny. Obszar mięśnia sercowego, który uległ zawałowi, zastępowany jest bowiem najczęściej blizną. Blizna pozawałowa pogarsza funkcję hemodynamiczną serca i może być etapem wstępnym tworzenia się tętniaka. Z tego też powodu poszukuje się alternatywnych sposobów leczenia, które prowadziłyby do regeneracji mięśnia sercowego i odtworzenia uszkodzonych włókien mięśniowych. Nadzieje wiąże się z pozawałowym podaniem komórek macierzystych. Jednocześnie poszukuje się również sposobów na leczenie dystrofii mięśniowych, które w chwili obecnej są nieuleczalne i prowadzą stopniowo do śmierci pacjenta.

Duże nadzieje wzbudziły pierwsze pionierskie doświadczenia opisujące regenerację mięśnia sercowego po podaniu w miejsce uszkodzenia mięśnia sercowego komórek szpiku kostnego [14, 15]. Zdolność do regeneracji mięśnia sercowego przez komórki

izolowane ze szpiku kostnego przypisywano zjawisku tzw. plastyczności hematopoetycznych komórek macierzystych [7, 14]. Pomimo że w chwili obecnej nie ulega wątpliwości, iż komórki macierzyste mięśni istnieją, to nie wiadomo jednak, jaki mają dokładnie fenotyp oraz czy rzeczywiście inne komórki macierzyste (np. hematopoetyczne) mogą wykazywać plastyczność i odróżnicować się w komórki mięśni [8].

W związku z brakiem przekonujących dowodów na istnienie zjawiska plastyczności komórek hematopoetycznych zakładamy, że z myślą o regeneracji mięśnia sercowego powinno się zoptymalizować metody izolacji ukierunkowanych już liniowo macierzystych komórek mięśniowych. Komórki po przeszczepieniu mogą się bowiem różnicować w mioblasty. Po opracowaniu odpowiednich metod hodowlanych będzie można je również namnażać *in vitro* przed podaniem pacjentowi. W przypadku mięśni szkieletowych duże nadzieje kliniczne wiąże się ze wspomnianymi już komórkami satelitarnymi.

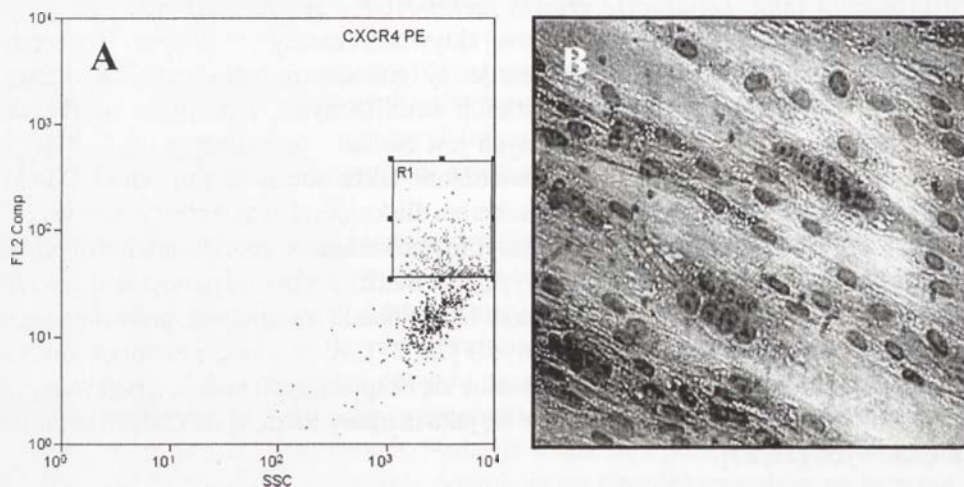
MARKERY KOMÓREK SATELITARNYCH

Przed opracowaniem metody izolacji czystej populacji komórek satelitarnych niezbędne stało się dokładne poznanie ich fenotypu. Obecnie znanych jest kilka markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych komórek satelitarnych. Komórki satelitarne mięśni mają na swojej powierzchni białko c-met, które jest receptorem dla czynnika wzrostu hepatocytów zwanego inaczej czynnikiem rozproszenia (ang. *hepatocyte growth factor-HGF / scatter factor/SF*) [22, 27]. Receptor ten jest receptorem o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej i występuje na wielu komórkach pochodzących z mezodermy i endodermy. Jego obecność wykazano również na spoczynkowych komórkach satelitarnych. Kolejnym markerem powierzchniowym komórek satelitarnych jest białko – M kadheryna [22, 27]. Na powierzchni komórek satelitarnych stwierdzono także obecność antygenu CD34 [1, 27], który jak wiadomo jest również markerem dla komórek macierzystych krwi [12], a także komórek śródbłonna [21]. Innymi markerami komórek satelitarnych są mięśniowo specyficzne czynniki transkrypcyjne. Bardzo szybko od momentu aktywacji/stymulacji tych komórek, np. przez uszkodzenie tkanki mięśniowej, pojawiają się w nich białka transkrypcyjne MYF-5 i MyoD [22, 27]. W momencie różnicowania się komórek w miotuby następuje zmniejszenie się ekspresji tych białek, a pojawiają się białka miogenina i MRF4, które stosuje się jako markery bardziej dojrzałych komórek mięśniowych [22, 27].

RECEPTOR CXCR4 JAKO NOWY MARKER KOMÓREK SATELITARNYCH

Receptor CXCR4 należy do rodziny receptorów chemokinowych. Jest to receptor mający siedem domen przezbłonowych, który sprzężony jest z tzw. białkami G [20]. Jego jedynym i swoistym ligandem jest czynnik pochodzenia podścieliskowego 1 (ang. *Stromal Derived Factor 1* – SDF-1) [20]. CXCR4 znajduje się na limfocytach T i bierze udział jako koreceptor we wnikanii wirusa HIV do komórek hematopoetycznych [6, 10]. Dzięki badaniom na myszach pozbawionych ekspresji tego receptora lub jego ligandu wykazano, iż receptor ten występuje także na komórkach macierzystych krwi i jest odpowiedzialny za migrację komórek macierzystych z wątroby płodowej do szpiku kostnego oraz zapoczątkowanie hematopoezy szpikowej [16, 20]. Ostatnie doniesienia wskazują również iż receptor ten może być także obecny na komórkach macierzystych innych tkanek. Występuje on m.in. na komórkach macierzystych nerwowych i wątrobowych oraz komórkach zarodkowych [9, 25].

Badania przeprowadzone przez naszą grupę wykazały, że receptor CXCR4 występuje także na komórkach satelitarnych mysich mięśni szkieletowych. Wykorzystując do badań model mysich linii komórkowych C2C12 i G7 uzyskanych z komórek satelitarnych, stwierdziliśmy, że receptor ten jest funkcjonalny. Mysie komórki satelitarne odpowiadały bowiem na stymulację czynnikami SDF-1 w testach chemotaksji, aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych oraz pobudzenia kanałów

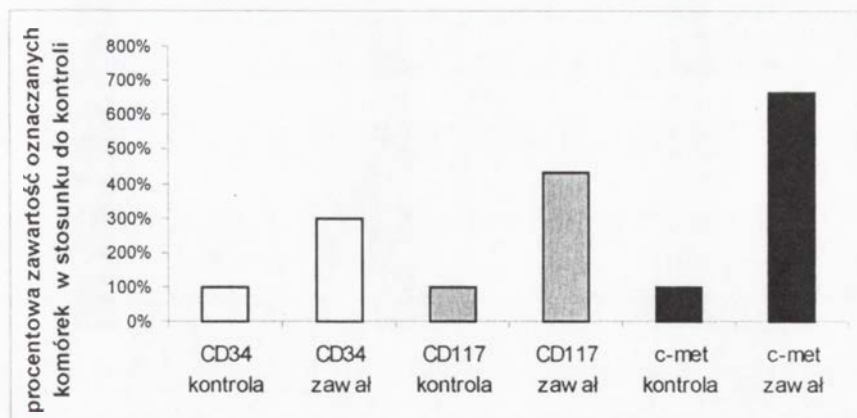


RYCINA 1. Komórki CXCR4 pozytywne tworzą miotuby w medium różnicującym. Panel A – cytogram komórek sortowanych na obecność antygenu CXCR4. Panel B – zdjęcie z mikroskopu świetlnego przedstawiające miotuby powstałe z wysortowanych komórek CXCR4 dodatnich po indukcji różnicowania za pomocą zmniejszenia stężenia surowicy w środowisku hodowlanym

przepływu wapniowego [19]. Przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw ludzkiemu receptorowi CXCR4 wyizolowaliśmy również populację komórek CXCR4 dodatnich z mięśni szkieletowych, takich jak mięsień biodrowo-lędźwiowy oraz mięsień prosty brzucha. Komórki te w warunkach indukujących proliferację i różnicowanie komórek satelitarnych (niskie stężenie surowicy w medium hodowlanym) wytworzyły w naszych hodowlach *in vitro* wielokomórkowe miotuby (ryc. 1). Oznacza to, że ludzkie komórki satelitarne, podobnie jak mysie, również mają na swojej powierzchni receptor dla SDF-1. Obecność CXCR4 na powierzchni tych komórek będziemy w dalszych badaniach wykorzystywać do izolacji populacji komórek mięśniowych wzbogaconych w komórki satelitarne.

Wiadomo, że oś CXCR4-SDF-1 pełni kluczową rolę w zagnieżdżaniu się hematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym [16, 20]. W badaniach wstępnych wykazaliśmy, że SDF-1 jest wydzielany przez mięsień sercowy i mięsień szkieletowe [17]. Stwierdziliśmy ponadto, że ekspresja SDF-1 zwiększa się podczas stresu tkankowego wynikającego m.in. z niedotlenienia mięśnia sercowego. Ilość mRNA dla SDF-1 (mierzona za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym) wzrosła w mięśniu sercowym po 12 godzinach od momentu skrwawienia 48-krotnie w porównaniu z kontrolą. Wskazuje to, że oś CXCR4-SDF-1 może pełnić kluczową rolę w zagnieżdżaniu/migracji komórek satelitarnych w tkance mięśniowej. Ponieważ ekspresja SDF-1 wzrasta podczas uszkodzenia mięśni, uszkodzone tkanki mogą przyciągać CXCR4 dodatnie komórki satelitarne z krążenia, które po zagnieżdżeniu w mięśniach biorą udział w procesach regeneracji.

CXCR4 może mieć praktyczne zastosowanie do izolacji wczesnych komórek mięśniowych do celów klinicznych.

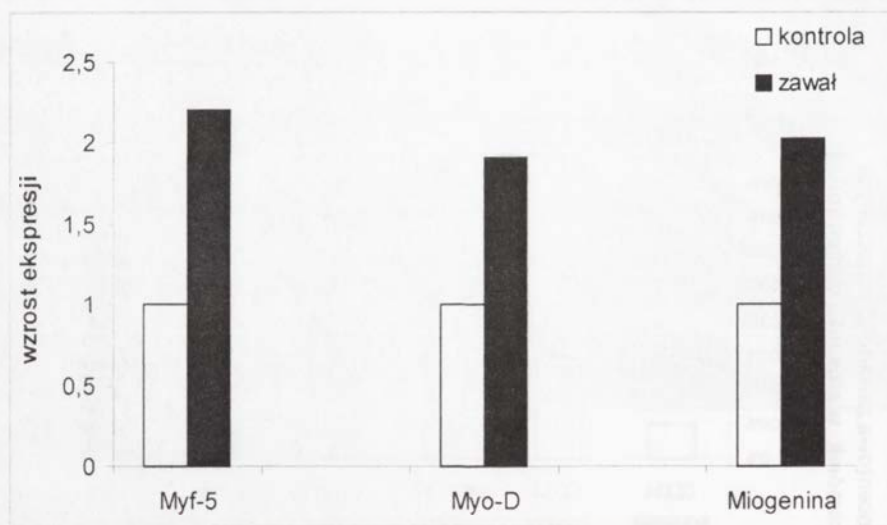


RYCINA 2. Porównanie zawartości krążących komórek wykazujących ekspresję antygenów CD34, CD117 i c-met u pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego w porównaniu z grupą kontrolną

MOBILIZACJA KOMÓREK MACIERZYSTYCH/ PROGENITOROWYCH MIĘŚNI PODCZAS ZAWAŁU MIĘŚNIA SERCOWEGO

W ciągu kilku ostatnich lat pojawiły się prace pokazujące, iż komórki izolowane ze szpiku kostnego mogą brać udział w regeneracji mięśnia sercowego po zawale mięśnia sercowego [13, 14]. Inne badania wykazały, że w przeszczepionym sercu dawcy mogą pojawić się komórki mięśniowe pochodzące od biorcy [12]. Ponieważ wykazaliśmy, że komórki satelitarne mięśni mają na swojej powierzchni CXCR4, a także że mięsień sercowy wykazuje ekspresję SDF-1, która wzrasta w stanie uszkodzenia tkankowego – postawiliśmy hipotezę, że komórki te mogą być przyciągane z krążenia przez cytokiny wydzielane podczas uszkodzenia mięśnia sercowego, aby następnie brać udział w regeneracji uszkodzonych tkanek.

Aby odpowiedzieć na to pytanie, badaliśmy, czy w krwi obwodowej podczas uszkodzenia tkanki mięśniowej pojawiają się komórki o fenotypie wczesnych komórek mięśniowych. Jako model przyjęliśmy zawał mięśnia sercowego. Rycina 2 pokazuje, że w czasie zawału znacznie wzrasta liczba krążących we krwi obwodowej komórek mających na swej powierzchni c-met, CD117 i CD34. Krążące komórki wykazują również zwiększoną ekspresję czynników transkrypcyjnych specyficznych mięśniowo (ryc. 3). Za pomocą testu ELISA wykazaliśmy również wzrost poziomu szeregu cytokin w surowicy pacjentów po przebytych zawale, w tym G-CSF (zawał – 57,5 pg/ml w kontrola – 85,5 pg/ml), co może tłumaczyć zaobserwowaną przez nas mobilizację tych komórek z innych obszarów tkanki mięśniowej do krwi obwodowej.



RYCINA 3. Ekspresja mRNA dla mięśniowo specyficznych czynników transkrypcyjnych w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej otrzymanej od pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego. Do pomiaru wykorzystana została technika RT-PCR w czasie rzeczywistym. Pacjenci po zawale – czarne słupki, grupa kontrolna – białe słupki

WYKORZYSTANIE KOMÓREK SATELITARNYCH W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

W mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym istnieją nisze SDF-1 dodatnie, w których mogą się zagnieżdżać komórki CXCR4-pozytywne, np. mięśniowe komórki satelitarne. Uważamy również, że komórki satelitarne podobnie jak hematopoetyczne komórki macierzyste mogą być dodatkowo mobilizowane do krwi obwodowej w różnych stanach stresu związanych z uszkodzeniem tkanki mięśniowej (uszkodzenie mięśni szkieletowych lub zawał mięśnia sercowego). W sytuacji takiej komórki satelitarne z nieuszkodzonych tkanek (mięśnie, szpik kostny) są mobilizowane do krwi i biorą następnie udział w regeneracji uszkodzonych tkanek. Jednym z czynników, który może kierować zasiedlaniem mobilizowanych komórek satelitarnych w uszkodzonych tkankach, może być SDF-1, uwalniany w wyniku hipoksji z niedotlenionego serca przez komórki zrębu tkanki mięśniowej.

Zakładając, że komórki satelitarne i/lub macierzyste komórki mięśnia sercowego podobnie jak komórki macierzyste krwi krążą w krwi obwodowej, uważamy, że mogą one być w przyszłości pozyskiwane podczas leukoferezy. Komórki takie mogą być następnie wykorzystywane do celów regeneracji tkanki mięśniowej. Zespół nasz prowadzi obecnie badania nad optymalizacją kliniczną powyższej procedury.

LITERATURA

- [1] BEAUCHAMP JR, HESLOP L, YU DS, TAJBAKSH S, KELLY RG, WERNIG A, BUCKINGHAM ME, PARTRIDGE TA, ZAMMIT PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1221–1234.
- [2] BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMICA, ANVERSA P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1750–1757.
- [3] BISCHOFF R. The satellite cell and muscle regeneration. W: Engel AG, Franszini-Armstrong C [red.] Myogenesis. McGraw Hill, New York. 1994: 97–118.
- [4] BUCKINGHAM M, BAJARD L, CHANG T, DAUBAS P, HADCHOUEL J, MEILHAC S, MONTARRAS D, ROCANCOURT D, RELAIX F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 2003; **202**: 59–68.
- [5] BORYCKI AG, LI J, JIN F, EMERSON CP, EPSTEIN JA. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development* 1999; **126**: 1665–1674.
- [6] CAIRNS JS, D'SOUZA MP. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nature Med* 1998; **4**: 563–568.
- [7] GOODELL MA, JACKSON KA, MAJKA SM, MI T, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 2001; **938**: 208–218.
- [8] GOODELL MA. Stem-cell „plasticity”: befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol* 2003; **10**: 208–213.
- [9] HATCH HM, ZHENG D, JORGENSEN ML, PETERSEN BE. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; **4**: 339–351.
- [10] HONCZARENKO M, MACHALIŃSKI B. Udział chemokin oraz receptorów chemokinowych w patogenezie zakażenia wirusem HIV. *Post Biol Kom* 1997; **25**: 283–310.

- [11] HUGHES S. Cardiac stem cells. *J Pathol* 2002; **197**: 468–478.
- [12] JACKSON KA, MAJKA SM, WULF GG, GOODELL MA. Stem cells: a minireview. *J Cell Biochem* 2002; **38**: 1–6.
- [13] MENNERICH D, SCHAFFER K, BRAUN T. Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev* 1998; **73**: 147–158.
- [14] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705.
- [15] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001; **938**: 221–229.
- [16] PELED, A., I. PETIT, O. KOLLET, M. MAGID, T. PONOMARYOV, T. BYK, A. NAGLER, H. BENHUR, A. MANY, L. SHULTZ, O. LIDER, R. ALON, D. ZIPORI, T. LAPIDOT. Dependence of human stem cells engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; **283**: 845–848.
- [17] PITUCH-NOWOROLSKA A, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, BAJ-KRZYWORZEKA M, URBANOWICZ B, MALEC E, RATAJCZAK MZ. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 13–21.
- [18] QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; **346**: 5–15.
- [19] RATAJCZAK MZ, MAJKA M, KUCIA M, DRUKALA J, PIETRZKOWSKI Z, PEIPER S, JANOWSKA-WIECZOREK A. Expression of Functional CXCR4 by Muscle Satellite Cells and Secretion of SDF-1 by Muscle-Derived Fibroblasts is Associated with the Presence of Both Muscle Progenitors in Bone Marrow and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Muscles. *Stem Cells* 2003; **21**: 363–371.
- [20] ROSSI D, ZLOTNIK A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu Res Immunol* 2000, **18**: 217–242.
- [21] SCHATTEMAN GC, AWAD O. In vivo and in vitro properties of CD34+ and CD14+ endothelial cell precursors. *Adv Exp Med Biol* 2003; **522**: 9–16.
- [22] SEALE P, RUDNICKI MA. A new look at the origin, function, and „stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; **218**: 115–124.
- [23] SEALE P, SABOURIN LA, GIRGIS-GABARDO A, MANSOURI A, GRUSS P, RUDNICKI MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; **102**: 777–786.
- [24] SONNENBERG E, WEIDNER KM, BIRCHMEIER C. Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis. *EXS* 1993; **65**: 381–394.
- [25] STUMM RK, ZHOU C, ARA T, LAZARINI F, DUBOIS-DALCQ M, NAGASAWA T, HOLLT V, SCHULZ S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 2003; **23**: 5123–5130.
- [26] URBANEK K, QUAINI F, TASCIA G, TORELLA D, CASTALDO C, NADAL-GINARD B, LERI A, KAJSTURA J, QUAINI E, ANVERSA P. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10440–10445.
- [27] ZAMMIT P, BEAUCHAMP J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 2001; **68**: 193–204.

Adres autora: ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków
marcinmarek@hotmail.com

KOMÓRKI PROGENITOROWE ŚRÓDBŁONKÓW: POCHODZENIE, CHARAKTERYSTYKA I PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA W TERAPII

ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS: ORIGIN, CHARACTERISTICS
AND THEIR FUTURE THERAPEUTIC USE

Danuta DUŚ i Maria PAPROCKA

Laboratorium Oddziaływań Międzykomórkowych, Zakład Immunologii Lekarskiej,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie: Śródbłonki naczyniowe oraz komórki krwi wywodzą się ze wspólnej komórki mezodermalnej – hemangioblastu. Potwierdzeniem bliskiego pokrewieństwa obu linii komórkowych są wspólne antygeny, występujące na wczesnych etapach różnicowania. Komórki prekursorowe dla śródbłonnków, definiowane jako CD34⁺ CD133⁺ Flk-1⁺, dają się różnicować w hodowli *in vitro* do komórek śródbłonkowych. Progenitory komórek śródbłonkowych, izolowane ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej oraz z krwi obwodowej, *in vivo* mogą wbudowywać się w ścianę uszkodzonego naczynia i podejmować funkcje śródbłonka. Opanowanie technik izolacji i propagacji tych komórek stwarza potencjalną możliwość ich wykorzystania w terapii schorzeń wymagających reparacji naczyń krwionośnych, zwłaszcza zawału mięśnia sercowego. Bliższe poznanie mechanizmów rządzących neoangiogenezą być może pozwoli również na kontrolę wzrostu nowotworów.

Słowa kluczowe: progenitorowe komórki śródbłonnków, CD34, VEGF-R2, waskulogeneza, angiogeneza, choroba niedokrwienna, nowotwory.

Summary: Differentiation of endothelial cells and hematopoiesis are closely linked processes due to common ancestors, hemangioblasts. Endothelial progenitor cells (EPCs) are defined as CD34⁺ CD133⁺ Flk-1⁺ stem cells, which differentiate into endothelial cells *in vitro* and could be incorporated into sites of pathological neovascularization *in vivo*. Endothelial progenitors have been isolated from human bone marrow, umbilical cord blood and GM-CSF-mobilized peripheral blood. To date, most studies on EPCs differentiation concerned their phenotypic and biological characteristics. Presently, the possibilities of therapeutic use of the isolated endothelial progenitor cells are considered. Methods are developed to isolate and propagate these cells for their future application, for repairing of damaged or degenerating endothelia in ischemia and, particularly, myocardial infarction. On the other hand, inhibiting the recruitment of endothelial progenitors might provide a novel approach to limit tumor angiogenesis.

*Praca była finansowana z grantu PBZ-KBN 083/P05/08.

Key words: endothelial progenitor cells, CD34, VEGF-R2, neovascularization, angiogenesis, ischemia, cancer.

WSTĘP

W trakcie rozwoju zarodkowego systemu krwiotwórczy i naczyniowy powinny rozwijać się równolegle, aby zapewnić dostateczny dostęp tlenu i czynników odżywczych do tworzących się tkanek i narządów. Oba rodzaje komórek: komórki krwi oraz śródbłonki naczyniowe wywodzą się z mezodermalnej, wspólnej dla obu linii różnicowania komórki macierzystej, określanej mianem hemangioblastu. W trakcie embriogenezy wysepki krwiotwórcze tworzą się z agregatów komórek hemangioblastycznych, których wewnętrzna warstwa ulega następnie różnicowaniu do komórek krwiotwórczych, zaś zewnętrzna – do komórek śródbłonkowych (ang. *endothelial cells*, ECs).

Pierwszym poznany etapem różnicowania się hemangioblastu z mezodermy jest aktywacja genu dla czynnika transkrypcyjnego *SCL/tal-1* [13, 31]. W następnych etapach różnicowania ekspresja tego genu jest istotna dla linii hematopoetycznej, nie wydaje się jednak mieć związku z różnicowaniem w kierunku śródbłonków. Zidentyfikowano też niektóre inne geny, istotnie zaangażowane w proces wczesnej hematopoezy jak również tworzenie naczyń krwionośnych, kodujące inne czynniki transkrypcyjne, np. *AML1* (Cbfa2/Runx1/AML1); receptory o aktywności kinazy tyrozynowej *Flk-1* (VEGFR-2), *Tie-2*, *Eph* i sjalomucyny: antygen CD34, trombomucynę i AA4 oraz niektóre cząsteczki adhezyjne, takie jak VLA-4 oraz LFA-1. Dalszym potwierdzeniem bliskiego pokrewieństwa układu krwiotwórczego z układem naczyniowym jest antygen CD133 (AC133) stanowiący wspólną determinantę antygenową, obecną na komórkach wczesnych progenitorów [7, 12, 23, 47].

WASKULOGENEZA VS. ANGIOGENEZA

O ile proces formowania układu naczyniowego w życiu płodowym jest stosunkowo dobrze poznany, o tyle wiedza na temat postnatalnych procesów naprawy uszkodzonych oraz tworzenia nowych naczyń do niedawna była fragmentaryczna. Uważano, że waskulogeneza, czyli formowanie nowych naczyń z komórek progenitorowych (angioblastów), może zachodzić jedynie w życiu płodowym. Waskulogeneza polega na lokalnym namnażaniu i różnicowaniu się komórki progenitorowej do komórek śródbłonkowych, organizujących się następnie w pierwotną sieć naczyniową [40]. Drugi z procesów tworzenia naczyń, występujący również u dorosłych osobników, nosi nazwę angiogenezy. W tym przypadku tworzenie nowych naczyń odbywa się w drodze proliferacji oraz migracji komórek śródbłonna istniejących naczyń [17]. Angiogeneza jest procesem wieloetapowym. Zaczyna się, gdy w otoczeniu uformowanej kapilary pojawiają się czynniki mogące aktywować ECs i pobudzać ich proliferację, takie jak

np. VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). Potem następuje destabilizacja naczyń, objawiająca się między innymi odsuwaniem się pericytów od śródbłonek i produkcją przez ECs proteaz, degradujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix proteins*; ECM). W wolną przestrzeń migrują ECs, w kierunku gradientu czynnika angiogennego. Po migracji ma miejsce proliferacja ECs i ich reorganizacja, zmierzająca do wytworzenia rurki, która przejmie funkcję nowego naczyń. Nowopowstałe naczynie tworzy anastomozy z sąsiadującymi naczyniami, co umożliwia zapoczątkowanie przepływu krwi. Dojrzewanie naczyń polega na odtworzeniu wyjściowej struktury ECM otaczającej naczynie i wejście w kontakt z pericytami, co stabilizuje nowe naczynie [40].

Zjawisko, zwane neowaskularyzacją postnatalną, zachodzi fizjologicznie, jak również w stanach patologicznych. W warunkach fizjologicznych ma miejsce u kobiet w macicy i jajnikach w trakcie cyklu menstruacyjnego oraz w czasie ciąży. Szczególną, pozytywną rolę odgrywa możliwość odtworzenia sieci naczyniowej w trakcie regeneracji uszkodzonych tkanek. Proces angiogenezy towarzyszy jednak także niektórym stanom patologicznym: chorobom reumatycznym, retinopatii cukrzycowej i retinopatii u wcześniaków, a także chorobom nowotworowym, w których rozrost sieci naczyniowej jest zjawiskiem niekorzystnym.

PROGENITORY KOMÓREK ŚRÓDBŁONKOWYCH

Dopiero w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia wykazano, że postnatalna neowaskularyzacja nie polega jedynie na ekspansji i proliferacji komórek śródbłonek z istniejących naczyń (angiogenezie), ale zachodzi również przy udziale krążących w organizmie komórek progenitorowych dla śródbłonek naczyniowych (ang. *endothelial precursor cells*; EPCs), uwalnianych ze szpiku kostnego. Obecnie wiadomo, że hemangioblasty jak również wyżej zróżnicowane formy EPCs są obecne nie tylko w życiu płodowym, ale także u dorosłych osobników w szpiku i krwi obwodowej. Krążące EPCs mogą brać udział w procesach naprawczych oraz w tworzeniu nowych naczyń [8, 36].

Od roku 1997 pojawiają się doniesienia pokazujące, że istnieje możliwość uzyskania komórek o fenotypie śródbłonekowym z ich komórek progenitorowych, drogą hodowli *in vitro*. Asahara i współpracownicy z Tufts University School of Medicine, Boston, MA, pierwsi wykazali obecność EPCs w populacji komórek CD34⁺ z krwi człowieka, zdolnych do różnicowania się w hodowli *in vitro* w kierunku śródbłoneka [2]. Następnie wykazali, że mogą one wbudowywać się w miejsca neowaskularyzacji w układach doświadczalnych *in vivo*. Na myszach wykazano, że EPCs biorą udział zarówno w fizjologicznych procesach regeneracji, zasiedlając naczynie ciążka żółtego oraz endometrium, jak również w patologicznych – w doświadczalnej niedokrwienności kończyn oraz w zawale serca. W tych przypadkach EPCs lokalizowały się w miejscach reparacji i odtwarzania nowych naczyń. Z kolei w przeszczepialnym mysim raku jelita

MCA38, EPCs wbudowywały się w nowotworzone naczynia krwionośne [1]. Obserwacje Asahary potwierdziły badania grupy Shi i wsp. [44], którzy izolowali komórki progenitorowe dla śródbłonnków zarówno z krwi obwodowej, jak również ze szpiku kostnego oraz z krwi pępowinowej. Komórki ekspresjonujące antygen CD34⁺ udało się w trakcie hodowli *in vitro* ukierunkować do fenotypu charakterystycznego dla ECs. Komórki te były włączane w miejsca neowaskularyzacji u zwierząt doświadczalnych. Murohara i wsp. [37] także wykazali, że ludzka krew pępowinowa może być dogodnym źródłem progenitorowych komórek śródbłonka, które, po podaniu szczurom nu/nu, biorą udział w neowaskularyzacji.

FENOTYP KOMÓREK PROGENITOROWYCH DLA ŚRÓDBŁONKÓW

Kiedy okazało się, że EPCs można wykorzystywać do odbudowy zmienionych chorobowo naczyń, istotne stało się bliższe poznanie ich fenotypu i właściwości biologicznych. Obecnie wiadomo, że większość EPCs stanowi subpopulację komórek o fenotypie: CD34⁺, Flk-1/VEGFR-2⁺, Tie-2⁺, Sca⁺, CD133⁺. Antygen CD34 jest glikoproteiną błonową o masie cząsteczkowej 90–120 kD, ekspresjonowaną przez hemangioblast do etapu progenitorów poszczególnych linii komórek krwiotwórczych. W przypadku komórek linii śródbłonkowej, CD34 może być obecny w trakcie całego procesu ich różnicowania, łącznie z terminalnie zróżnicowaną EC. Uważa się, że cząsteczka ta pośredniczy we wzajemnych oddziaływaniach adhezyjnych tych komórek.

Asahara i współpracownicy poszukiwali EPCs, badając komórki CD34⁺, izolowane z krwi obwodowej dorosłego człowieka. Po siedmiu dniach hodowli *in vitro* pojawiały się komórki o fenotypie ECs (CD62E⁺, pochłaniające ac-LDL (ang. *acetylated low-density lipoprotein*), CD34⁺, CD31⁺, Flk-1⁺, Tie-2⁺), zdolne do tworzenia struktur podobnych do naczyń włosowatych. Komórki te, po podaniu myszom z doświadczalną chorobą niedokrwinną kończyn, były w stanie podjąć funkcję ECs [2]. Największym osiągnięciem tej pracy było wykazanie, że w krwi obwodowej dorosłego człowieka znajdują się komórki progenitorowe, które potencjalnie mogą zróżnicować się do ECs. Zasadniczym mankamentem natomiast był fakt, że wyselekcjonowane komórki zawierały tylko 15% komórek CD34⁺, a czynnikiem stymulującym różnicowanie był ekstrakt z mózgu bydłęcego, więc nie do końca było jasne, które komórki i pod wpływem jakich czynników wzrostowych ulegają różnicowaniu.

W następnych latach komórki o podobnej charakterystyce w wielu ośrodkach izolowano ze szpiku dorosłych osobników, z krwi pępowinowej oraz z embrionów. Badania dotyczyły głównie definiowania szlaków rozwojowych ECs, to znaczy określenia fenotypów wczesnych i późnych EPCs, oraz zbadania, jakie czynniki wzrostowe i oddziaływania międzykomórkowe odgrywają rolę w ich namnażaniu i różnicowaniu. Większość badaczy izoluje komórki do hodowli poprzez selekcję pozytywną komórek ekspresjonujących antygen CD34 lub CD133. Antygen CD133

(AC133) opisany został w 1997 r. na wypustkach błony cytoplazmatycznej niektórych CD34⁺ macierzystych komórek hematopoetycznych. Jest to glikoproteina powierzchniowa, zawierająca pięć domen transmembranowych, o nieokreślonej dotychczas funkcji [34]. Antygen CD133 wydaje się być bardziej dogodnym markerem do izolacji EPCs niż CD34, ponieważ jego ekspresja zanika w trakcie nabywania przez różnicujące się komórki fenotypu śródbłonkowego, podczas gdy ekspresja CD34 może utrzymywać się nawet na terminalnie zróżnicowanych ECs. W pracy, w której komórki izolowano wykorzystując obecność antygenu CD133, znakomita większość izolowanych z krwi obwodowej komórek CD133⁺ koekspresjonowała także CD34. Po dwutygodniowej hodowli, w warunkach promujących różnicowanie, ponad 99% tych komórek miało cechy charakterystyczne dla komórek śródbłonkowych: ekspresjonowało vWF, Flk-1, Tie-2 i wiązało lektynę z *Ulex europaeus* [19]. Jako komórki wyjściowe do różnicowania w kierunku ECs można również stosować komórki ekspresjonujące Flk-1⁺. Komórki te wydają się być najwcześniejsze na tym szlaku różnicowania. W hodowli *in vitro* początkowo nie wykazują ekspresji antygenu CD34 ani innych markerów ECs (VE-kadheryny, PECAM-1). Hodowane w obecności linii wspomagającej, te bardzo wczesne progenitory były zdolne do różnicowania się do komórek ekspresjonujących najpierw VE-kadherynę i PECAM-1, a dopiero później CD34. Powyższe doświadczenia opisała grupa M. Hirashima [25], przedstawiając cztery kolejne zestawy cech fenotypowych embrionalnych komórek Flk-1⁺, różnicujących się w kierunku EC, rekapitulujące embriogenezę, a prawdopodobnie także procesy zachodzące postnatalnie:

Flk-1⁺, VE-kadheryna⁻, PECAM-1⁻, CD34⁻ → Flk-1⁺, VE-kadheryna⁺, PECAM-1⁺, CD34⁻ → Flk-1⁺, VE-kadheryna⁺, PECAM-1⁺, CD34⁺ → Flk-1⁺, VE-kadheryna⁺, PECAM-1⁺, CD34⁺.

Grupa C.M. Verfaillie, badała tzw. wielopotentjalne komórki progenitorowe (ang. *multipotent adult progenitor cells*; MAPC), izolowane ze szpiku dorosłych osób [39]. Podają oni, że MAPC mogą się różnicować w hodowli *in vitro* m.in. do ECs. W opisywanym eksperymencie, wyjściowymi komórkami były mononukleary ze szpiku kostnego, z których usunięto komórki CD45⁺ oraz komórki ekspresjonujące glikoforynę A. Pozostałe komórki zdolne były do długotrwałej proliferacji, bez oznak starzenia się, pod wpływem jedynie EGF i PDGF-BB. Po dodaniu VEGF komórki MAPC o fenotypie: Flk-1⁺, Flt-1⁺, CD133⁺, VCAM⁻, CD62P⁻, CD62E⁻, vWF⁻, CD31⁻, CD34⁻, MUC18⁻, VE-kadheryna⁻, różnicowały się, przechodząc w populację komórek o fenotypie śródbłonkowym: Flk-1⁺, Flt-1⁺, CD133⁻, VCAM⁻, CD62P⁺, CD62E⁺, vWF⁺, CD31⁺, CD34⁺, MUC18⁺, VE-kadheryna⁺. Zróżnicowane komórki, po stymulacji IL-1, były zdolne do ekspresji VCAM-1 i CD62E. Można więc sądzić, na podstawie cech fenotypowych i szlaku różnicowania, że MAPC są odpowiednikami wczesnych postaci EPCs [36].

W różnicowaniu i migracji ECs oraz formowaniu naczyń krwionośnych bierze udział cała plejada cytokin, chemokin i czynników wzrostowych. Do najlepiej poznanych cytokin, niezbędnych do proliferacji komórek śródbłonkowych należy naczyniowy, śródbłonkowy czynnik wzrostowy (ang. *vascular endothelial growth factor*; VEGF). VEGF jest znany głównie ze swojej aktywności proangiogennej, oprócz tego ma

działanie wazodylatacyjne i stymuluje migrację ECs. Aktywność VEGF realizowana jest przez swoiste receptory o aktywności kinazy tyrozynowej: VEGFR-1, (Flt-1), VEGFR-2 (ang. *fetal liver kinase*; Flk-1/KDR) oraz VEGFR-3 (Flt-3), rozmieszczone na różnych typach śródbłonnków [54]. Do efektywnej waskulogenezy konieczna jest aktywność VEGFR-2. Istnieje kilka wariantów oraz typów VEGF. Mają one zróżnicowane powinowactwo do poszczególnych receptorów oraz pośredniczą w różnych efektach biologicznych: proliferacji ECs (głównie poprzez VEGFR-2) lub ich migracji (głównie przez VEGFR-1) [18, 43]. Receptory dla VEGF bywają wykorzystywane jako markery EPCs. Wśród izolowanych z krwi pępowinowej komórek CD34⁺ znajduje się około 2% komórek ekspresjonujących CD133 i VEGFR-2, zdolnych do różnicowania się do ECs. Komórki te wykazywały ekspresję receptora dla chemokin CXCR4 i migrowały pod wpływem ligandu dla CXCR4 - SDF-1 (ang. *stromal derived factor – 1*). Co ciekawe, komórki te miały także ekspresję VE-kadheryny i selektyny-E, antygenów zazwyczaj uważanych za swoiste dla zróżnicowanych ECs [38]. Z kolei EPCs o fenotypie: CD34⁺, CD133⁺ i VEGFR-3⁺, hodowane w obecności VEGF, różnicowały się do komórek śródbłonka, pochłaniających ac-LDL, ekspresjonujących VE-kadherynę oraz LYVE-1 i podoplaninę, markery śródbłonnków naczyń limfatycznych [42].

Początkowo uważano, że EPCs to głównie „wczesne” komórki ekspresjonujące CD34⁺. Harraz i wsp. [22] przedstawili dane doświadczalne świadczące o tym, że komórki CD14⁺, które mają status CD34⁻, wykazują cechy EPCs. Frakcja monocytów, wzbogacona o komórki CD14⁺ (CD34⁻), w trakcie hodowli *in vitro* nabywała cechy fenotypowe ECs, prezentując jednak równocześnie niektóre antygeny komórek dendrytycznych. Postawiono hipotezę, że zależnie od warunków, komórki te mogą się różnicować w kierunku makrofagów, komórek dendrytycznych lub ECs. W eksperymencie *in vivo* pokazano, że komórki CD34⁻ oraz CD14⁺CD34⁻ wbudowują się do warstwy śródbłonka w regenerujących naczyniach u myszy z doświadczalną niedokrwistością kończyn, jednak aby ten proces przebiegał wydajnie, konieczne było równoczesne podanie komórek CD34⁺. Wbudowane w ścianę naczynia komórki stanowiły ok. 10% wszystkich komórek w nowotworzonych naczyniach. Wykazano tym samym, że we krwi obwodowej może znajdować się więcej EPCs, niż dotychczas sądzono [15]. Ukazują się również prace opisujące uzyskiwanie ECs w drodze hodowli niesortowanych mononuklearów krwi pępowinowej, czasem hodowanych nawet bez dodatku swoistych czynników wzrostowych [11, 14, 30].

Przedstawione powyżej prace wybrano subiektywnie, dla zilustrowania obecnego stanu wiedzy dotyczącej fenotypu i procesu różnicowania się EPCs do śródbłonnków. Podobnie jak w przypadku komórek linii krwiotwórczych, w krwi obwodowej, w krwi pępowinowej oraz w szpiku kostnym można wykazać istnienie EPCs, zdolnych do różnicowania się, w sprzyjających warunkach, w kierunku dojrzałych ECs. Najprawdopodobniej EPCs, zarówno krążące jak i osiadłe, znajdują się na kolejnych etapach różnicowania. Stosując różne metody separacji komórek i używając różnych mediów hodowlanych, a także kompozycji i stężeń cytokin do pobudzania proliferacji i różnicowania komórek wyjściowych, uzyskano wyniki różniące się znacznie między sobą. Aby odtworzyć *in vitro* mikrośrodowisko zębó komórek macierzystych, hodowle

prowadzono czasem w bezpośredniej ko-kulturze z komórkami zrębu lub w obecności czynników przez nie produkowanych.

BADANIA DOŚWIADCZALNE I KLINICZNE NAD ZASTOSOWANIEM EPCS W TERAPII

Opisanie w latach osiemdziesiątych czynników wzrostowych dla komórek macierzystych układu krwiotwórczego umożliwiło poznanie najważniejszych szlaków ich różnicowania, namnażanie tych komórek w warunkach hodowli *in vitro*, a następnie zastosowanie kliniczne zarówno samych komórek, jak i czynników mobilizujących i stymulujących ich proliferację. W przypadku komórek progenitorowych dla śródbłonek, potwierdzona w wielu ośrodkach obecność postnatalnych EPCs spowodowała podjęcie prób zmierzających do zastosowania tych komórek do odtworzenia śródbłonek i waskulatury uszkodzonej przez procesy chorobowe. Jedną z pierwszych była praca Shi i wsp. z 1998 r. ogłoszona w *Blood* [44], w której oczyszczone do 95% czystości ludzkie komórki CD34⁺ ze szpiku i krwi pępowinowej podjęły proliferację i różnicowały się na dakronowych protezach, po ich podaniu naświetlonym psom. W zespole Asahary badania nad zastosowaniem EPCs prowadzono na zwierzętach doświadczalnych stosując następujące modele: fizjologiczny (owulacja), regeneracji (gojenie się ran, waskulogeneza w mięśniu sercowym, w niedokrwionych kończynach dolnych), jak i patologiczny (wzrost guza nowotworowego). We wszystkich przypadkach stwierdzono wbudowywanie się podanych komórek w nowopowstałe naczynia [1]. W innych pracach wykazano, że EPCs ze szpiku biorą udział w neowaskularyzacji mózgu z wywołanym doświadczalnie udarem [55] i w regeneracji śródbłonek u zwierząt z indukowanym zapaleniem kłębuszków nerkowych [41]. Dowód na udział EPCs w neoendotelializacji ludzkiej aorty i naczyń obwodowych przedstawiony został w opisie przypadku letalnie napromieniowanego człowieka, który otrzymał transfuzję komórek macierzystych izolowanych z krwi obwodowej. Z autopsji wynikało, że ok. 25% ECs w aorcie pochodziło od dawcy przeszczepu [48]. Poza wykazaniem, że podane komórki były zdolne do osiedlenia się i różnicowania w organizmach biorców, w niektórych przypadkach udowodniono, że komórki te podjęły funkcję. U myszy z doświadczalnym niedokrwieniem kończyn dolnych podanie EPCs poprawiało zarówno neowaskularyzację, jak i przepływ krwi w naczyniach [29, 37].

Jednocześnie z pracami, w których pokazywano, że komórki EPCs rzeczywiście istnieją i że można próbować zastosować je w „waskulogenezie terapeutycznej” [26], pojawiło się wiele prac opisujących EPCs w kontekście różnych czynników wzrostowych i leków. Z klinicznego punktu widzenia potrzebne są substancje mobilizujące EPCs oraz przyspieszające ich proliferację i różnicowanie do ECs w organizmie pacjenta. Jednym z kandydatów jest VEGF, czynnik fizjologicznie regulujący zarówno proliferację, jak i funkcję ECs i ich progenitorów. Asahara i Isner [3] opisali w 1999 r. wpływ kilkukrotnego podania ludzkiego rekombinacyjnego VEGF na poziom

EPCs w krwi obwodowej myszy. Po kilku dniach podawania preparatu liczba krążących progenitorów wzrastała trzykrotnie. VEGF powodował również wyraźne podwyższenie neowaskularyzacji rogówki. Pozytywne wyniki badań na zwierzętach spowodowały podjęcie pierwszych prób u ludzi. Pacjentom z ostrymi stanami niedokrwiennymi kończyn dolnych podawano domięśniowo plazmidowe DNA, kodujące ludzki VEGF. Już po tygodniu nastąpiło 2,5-krotne podwyższenie w ich surowicy poziomu VEGF. Towarzyszyło mu 30-krotne zwiększenie się we krwi liczby komórek ekspresjonujących markery typowe dla EPCs (Flk-1, VE kadheryna, CD34) [28].

Erytropoetyna, która jest znany czynnikiem mobilizującym progenitory komórek krwiotwórczych, okazała się także czynnikiem wpływającym na mobilizację EPCs o fenotypie CD34⁺, Flk-1⁺ i wzmagającym neowaskularyzację niedokrwionych tkanek [24]. Co ciekawe, pokazano, że także neoangiogeneza, czyli proliferacja dojrzałych śródbłonnków w uszkodzonych tkankach jest wyższa w obecności niewielkich stężeń erytropoetyny [27]. Innym czynnikiem wzrostowym, który również powoduje, równoległe z mobilizacją progenitorów komórek krwiotwórczych, indukcję EPCs, jest GM-CSF [49]. Liczba EPCs krążących we krwi i osiadłych w szpiku zależna jest też od statusu hormonalnego. U kobiet z wysokim poziomem estrogenów stwierdzono podwyższenie liczby krążących EPCs. Przypuszcza się, że poza mobilizacją EPCs ze szpiku estrogen przedłuża żywotność tych komórek przez zahamowanie apoptozy [46].

Ostatnio ukazało się kilka prac opisujących nową aktywność statyn – leków obniżających poziom cholesterolu. Zarówno w układzie doświadczalnym, jak i u chorych leczonych statynami stwierdzono podwyższenie liczby krążących EPCs, a także indukcję ich różnicowania [9, 32]. Wykazano także pozytywny wpływ simvastatyny na reendotelializację tętnicy szyjnej szczura przez mysie EPCs. Lek ten powodował zarówno zwiększenie liczby EPCs, jak i podwyższał ich zdolność do adhezji przez aktywację integryn [52]. Wpływ statyn jest jednak zależny od dawki i sposobu podawania; są również prace donoszące o hamowaniu przez statyny różnicowania EPCs [50].

W urazach i w niektórych stanach chorobowych opisano występowanie znacznie podwyższonej ilości EPCs. U pacjentów z oparzeniami oraz po przeprowadzeniu operacji zakładającej *bypass*, już po 6–12 godzinach od urazu stwierdzano w krwi obwodowej 50-krotny wzrost liczby EPCs, definiowanych jako komórki VEGFR-2⁺, VE-kadheryna⁺, CD133⁺. Towarzyszył temu podwyższony poziom VEGF, który wracał do normy po 48–72 godz., tak zresztą jak i liczba EPCs [20]. Podobnie, podwyższoną liczbę krążących EPCs stwierdzano u chorych po zawale mięśnia sercowego. W tym przypadku EPCs utrzymywały się w krążeniu znacznie dłużej, osiągając maksimum na dzień siódmy [45]. Z kolei u pacjentów z przewlekłą chorobą wieńcową stwierdzano obniżony poziom komórek CD34⁺ Flk-1⁺, krążących we krwi obwodowej, z tym że najniższą liczbę EPCs stwierdzano u chorych palących [51].

Wzrost guza nowotworowego, uzależniony od dostatecznego dopływu substancji odżywczych dostarczanych z krwią, wymaga rozrostu oraz tworzenia nowych naczyń. Różnica pomiędzy angiogenezą nowotworową a procesem zachodzącym w czasie gojenia ran polega na tym, że w czasie gojenia ran, po wstępnym stadium intensywnej

neowaskularyzacji następuje dojrzewanie nowopowstałych naczyń lub ich regresja prowadząca do zbliznowacenia. W prawidłowych naczyniach obrót komórkowy śródbłónka jest minimalny. W nowotworach tzw. *angiogenic switch* [21] charakteryzuje się przewlekłym stadium wstępnym neowaskularyzacji, polegającym na ciągłej obecności różnicujących się komórek, przy braku dojrzewania naczyń i formowania zrębu. Dlatego określa się nowotwory mianem „nie gojących się zranień” [10]. W przebiegu choroby nowotworowej stwierdza się podwyższone ilości obecnych w krążeniu komórek o fenotypie śródbłónkowym (ang. *circulating endothelial cells*; CECs). U chorych z rakiem piersi i u pacjentów z białaczką wykazano kilkukrotny wzrost liczby CECs krążących we krwi [33]. Liczba tych komórek korelowała także z poziomem VEGF w plazmie krwi. Skuteczne postępowanie terapeutyczne powodowało spadek ilości CECs do poziomu, jaki występuje u osób z grupy kontrolnej. Ponieważ podwyższona liczba CECs w krążeniu statystycznie znamienne koreluje z masą guza, zaproponowano oznaczanie CECs u pacjentów z nowotworami, jako nieinwazyjną, alternatywną metodę oceny stopnia angiogenezy w guzie nowotworowym [4, 35, 53]. Z kolei w trakcie doświadczalnej chemioterapii myszy obarczonych ludzkim chłoniakiem wykazano, że jednorazowa, wysoka dawka cytotastyku powodowała maszyną mobilizację EPCs w kilka dni po podaniu. Przeciwnie, kilkakrotne podanie niskich dawek leku powodowało spadek liczby krążących EPCs i zdecydowanie lepsze ogólne efekty terapeutyczne. Zaproponowano, aby w planowaniu postępowania leczniczego zwrócić uwagę również na tę możliwość zmniejszenia ukrwienia guza nowotworowego [5,6].

Już w 1971 roku Folkman wskazywał na proces unaczynienia nowotworu jako na potencjalny cel terapeutyczny [16], ale mechanizmy generujące neowaskularyzację guza nowotworowego nie były jeszcze poznane. W latach dziewięćdziesiątych wiedziano już, że parakryne i autokryne czynniki angiogenne obecne w środowisku nowotworu powodują „odróżnicowanie” pobliskich komórek śródbłónkowych, pojawienie się na nich receptorów dla czynników wzrostowych, skutkujące ich intensywną proliferacją oraz migracją [17]. Obecnie wiadomo, że również krążące EPCs osiedlają się oraz różnicują, formując naczynia w guzie nowotworowym. Wydaje się, że zgromadzona dotychczas na ten temat wiedza otwiera drogę do celowanej, antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER J. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; **85**: 221–228.
- [2] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 965–967.
- [3] ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN D, IWAGURO H, INAI Y, SILVER M, ISNER JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; **18**: 3964–3972.

- [4] AUERBACH R, AKHTAR N, LEWIS RL, SHINNERS BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 2000; **19**: 167–172.
- [5] BERTOLINI F, MANCUSO P, MONESTIROLI S, GOBBI A, SHAKED Y, KERBEL RS. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 4342–4346.
- [6] BROWDER T, BUTTERFIELD C E, KRALING BM, SHI B, MARSHALL B, O'REILLY MS, FOLKMAN J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 1878–1886.
- [7] CHOI K, KENNEDY M, KAZAROV A, PAPADIMITRIOU JC, KELLER G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; **125**: 725–732.
- [8] CROSBY JR, KAMINSKI WE, SCHATTEMAN GC, MARTIN PJ, RAINES EW, SEIFERT RA, BOWEN-POPE DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000; **87**: 728–730.
- [9] DIMMELER S, AICHER A, VASA M, MILDNER-RIHM C, ADLER K, TIEMANN M, RUTTEN H, FICHTLSCHERER S, MARTIN H, ZEIHNER A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; **108**: 391–397.
- [10] DVORAK HF. Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; **315**: 1650–1659.
- [11] EGGERMANN J, KLICHE S, JARMY G, HOFFMAN K, MAYR-BEYRLE U, DEBATIN KM, WALTENBERGER J, BELTINGER C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*; a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 2003; **58**: 478–486.
- [12] EICHMANN A, CORBEL C, NATAF V, VAIGOT P, BREANT C, LE DOUARIN NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5141–5146.
- [13] ENDOH M, OGAWA M, ORKIN S, NISHIKAWA S. SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J* 2002; **21**: 6700–6708.
- [14] FAN CL, LI Y, GAO PL, LIU JJ, ZHANG XJ, ZHY DL. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 2003; **24**: 212–218.
- [15] FERNANDEZ-PUJOL B, LUCIBELLO FC, GEHLING UM, LINDEMANN K, WEIDNER N, ZUZARTE ML, ADAMKIEWICZ J, ELSASSER HP, MULLER R, HAVEMANN K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; **65**: 287–300.
- [16] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**: 1182–1186.
- [17] FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10931–10934.
- [18] FONG G-H, ROSSANT J, GERSENSTEIN M, BREITMAN ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; **376**: 66–70.
- [19] GEHLING UM, ERGÜN S, SCHUMACHER U, WAGENER C, PANTEL K, OTTE M, SCHUCH G, SCHAFHAUSEN P, MENDE T, KILIC N, KLUGE K, SCHÄFER B, HOSSFELD DK, FIEDLER W. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; **95**: 3106–3112.
- [20] GILL M, DIAS S, HATTORI K, RIVERA ML, HICKLIN D, WITTE L, GIRARDI L, YURT R, HIMEL H, RAFII S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2⁺ AC133⁺ endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; **88**: 167–174.
- [21] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**: 353–364.
- [22] HARRAZ M, JIAO C, HANLON HD, HARTLEY RS, SCHATTEMAN GC. CD34⁺ blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001; **19**: 304–312.
- [23] HATTORI K, DIAS S, HEISSING B, HACKETT NR, LYDEN D, TATENO M, HICKLIN DJ, ZHU Z, WITTE L, CRYSTAL RG, MOORE MA, RAFII S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenesis and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001; **193**: 1005–1014.
- [24] HEESCHEN C, AICHER A, LEHMAN R, FICHTLSCHERERS, VASA M, URBICH C, MILDNER-RIHM C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cells. *Blood* 2003; **102**: 1340–1346.
- [25] HIRASHIMA M, KATAOKA H, NISHIKAWA S, MATSUJOSHI N, NISHIKAWA SI. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood* 1999; **93**: 1253–1263.

- [26] ISNER JM, ASAHARA T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1231–1236.
- [27] JAQUET K, KRAUSE K, TAWAKOL-KHODAI M, GEIDEL S, KUCK KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002; **64**: 326–333.
- [28] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, GORDON R, TEPPER O, GRAVEREAUX E, PIECZEK A, IWAGURO H, HAYASHI SI, ISNER JM, ASAHARA T. Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 2000; **86**: 1198–1202.
- [29] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LI T, ISNER JM, ASAHARA T. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3422–3427.
- [30] KANG HJ, KIM SC, KIM YJ, KIM CW, KIM JG, AHN HS, PARK SI, JUNG MH, CHOI BC, KIMM K. Short-term phytohaemagglutinin-activated mononuclear cells induce endothelial progenitor cells from cord blood CD34⁺ cells. *Br J Haematol* 2001; **113**: 962–969.
- [31] LACAUD G, ROBERTSON S, PALIS J, KENNEDY M, KELLER G. Regulation of hemangioblast development. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **938**: 96–107.
- [32] LLEVADOT J, MURASAWA S, KUREISHI Y, UCHIDA S, MASUDA H, KAWAMOTO A, ISNER JM, ASAHARA T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilises bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; **108**: 399–405.
- [33] MANCUSO P, BURLINI A, PRUNERI G, GOLDBIRSCHE A, MARTINELLI G, BERTOLINI F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001; **97**: 3658–3661.
- [34] MIRAGLIA S, GODFREY W, YIN AH, ATKINS K, WARNKE R, HOLDEN JT, BRAY RA, WALLER EK, BUCK DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; **90**: 5013–5021.
- [35] MONESTIROLI S, MANCUSO P, BURLINI A, PRUNERIG, DELL'AGNOLA C, GOBBI A, MARTINELLI G, BERTOLINI F. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 4341–4344.
- [36] MOORE MA. Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 2002; **109**: 313–315.
- [37] MUROHARA T, IKEDA H, DUAN J, SHINTANI S, SASAKI K, EGUCHI H, ONITSUKA I, MATSUI K, IMAIZUMI T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1527–1536.
- [38] PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; **95**: 952–958.
- [39] REYES M, DUDEK A, JAHAGIRDAR B, KOODIE L, MARKER PH, VERFAILLIE CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; **109**: 337–346.
- [40] RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**: 671–374.
- [41] ROOKMAAKER MB, SMITS AM, TOLBOOM H, VAN 'T WOUT K, MARTENS AC, GOLDSCHMEDING R, JOLLES JA, VAN ZONNEVELD AJ, GRONE HJ, RABELINK TJ, VERHAAR MC. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2003; **163**: 553–562.
- [42] SALVEN P, MUSTJOKI S, ALITALO R, ALITALO K, RAFII S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34⁺ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; **101**: 168–172.
- [43] SATO TN, TOZAWA Y, DEUTSCH U, WOLBURG-BUCHHOLZ K, FUJIWARA Y, GENTRON-MAGUIRE M, GRIDLEY T, WOLBURG H, RISAU W, QIN Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; **376**: 70–74.
- [44] SHI Q, RAFII S, WU MH-D, WIJELATH ES, YU C, ISHIDA A, FUJITA Y, KOTHARI S, MOHLE R, SAUVAGE LR, MOORE MA, STORB RF, HAMMOND WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**: 362–367.
- [45] SHINTANI S, MUROHARA T, IKEDA H, UENO T, SASAKI K, DUAN J, IMAIZUMI T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; **103**: 2776–2779.
- [46] STREHLOW K, WERNER N, BERWEILER J, LINK A, DIRNAGL U, PRILLER J, LAUFS K, MILOSEVIC M, BOHM M, NICKENIG G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; **107**: 3059–3065.

- [47] SUDA T, TAKAKURA N, OIKE Y. Hematopoiesis and angiogenesis. *Int J Hematol* 2000; **71**: 99–107.
- [48] SUZUKI T, NISHIDA M, FUTAMI S, FUKINO K, AMAKI T, AIZAWA K, CHIBA S, HIRAI H, MAEKAWA K, NAGAI R. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim. *Cardiovasc Res* 2003; **58**: 487–492.
- [49] TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999 Apr; **5**(4): 434–438.
- [50] URBICH C, DERNBACH E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res* 2002; **90**: 737–744.
- [51] VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; **89**: e1–e7.
- [52] WALTER DH, RITTIG K, BAHLMANN FH, KIRCHMAIR R, SILVER M, MURAYAMA T, NISHIMURA H, LOSORODO DW, ASAHARA T, ISNER JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; **105**: 3017–3024.
- [53] WEIDNER N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol* 2000; **31**: 403–405.
- [54] WITMER AN, DAI J, WEICH HA, VRENSEN GF, SCHLINGEMAN RO. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. *J Histochem Cytochem* 2002; **50**: 767–777.
- [55] ZHANG ZG, ZHANG L, JIANG Q, CHOPP M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002; **90**: 284–288.

Adres autora: ul. Rudolfa Weigla 12, 53 114 Wrocław
e-mail: danuta@iitd.pan.wroc.pl

POSTĘPY W METODACH IZOLACJI I NAMNAŻANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA LUDZKIEGO*

ADVANCES IN METHODS OF ISOLATION AND EXPANSION OF HUMAN EPIDERMAL STEM CELLS

Justyna DRUKAŁA¹, Marcin MAJKA², Mariusz RATAJCZAK²

¹Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej Zakładu Biologii Komórki,
Wydział Biotechnologii UJ

²Zakład Transplantologii, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy, Collegium Medicum UJ

Streszczenie: Skóra ludzka jest organem bogatym w komórki macierzyste, które w hodowli *in vitro* tworzą tzw. holoklony. Komórki te wykazują wysoki poziom ekspresji $\beta 1$ - i $\alpha 6$ -integryny, białka p63, Delta1, a także β -kateniny. Wczesne keratynocyty budzą wiele zainteresowania w sferze badań zarówno podstawowych, jak klinicznych, z uwagi na ich potencjalną możliwość wykorzystania w leczeniu oparzeń i troficznym owrzodzeniach. Mimo że namnażane z małych biopsji *ex vivo* keratynocyty są z powodzeniem wykorzystywane w klinice, nasza wiedza o mechanizmach regulujących samoodnawianie i różnicowanie komórek macierzystych skóry jest bardzo ograniczona. Celem prowadzonych przez nas badań jest uzyskanie czystej populacji macierzystych komórek naskórka i ich maksymalnie wydajne namnażanie w celu wykorzystania klinicznego. Stwierdziliśmy, że receptor c-kit jest bardzo przydatny w oczyszczaniu keratynocytów z frakcji melanocytów w hodowli pierwotnej. Rozpoczęliśmy również próby fenotypowania wczesnych keratynocytów wykorzystując wybrane przeciwciała (przeciwko CXCR1, CD44H, c-met, $\alpha 3$ -, 5-, 6-integrynom, FAS) w celu zidentyfikowania markerów powierzchniowych, które mogłyby być wykorzystane do izolacji macierzystych komórek skóry. Jako markera służącego izolacji wczesnych komórek naskórka formujących *in vitro* holoklony użyliśmy przeciwciała przeciwko $\beta 1$ -integrynie jednocześnie barwiąc komórki rodaminą 123. Zaobserwowaliśmy, że komórki najslabiej barwiące się rodaminą 123 i jednocześnie wykazujące najwyższą ekspresję $\beta 1$ -integryny są wysoce wzbogacone w komórki formujące w hodowli tzw. holoklony. Wykorzystując tę subpopulację komórek testowaliśmy następnie wpływ wybranych czynników wzrostu i cytokin na ich proliferację i różnicowanie. Próbowaliśmy jednocześnie skorelować dane z hodowli *in vitro* z aktywacją wybranych szlaków transdukcji sygnałów regulujących proliferację i przeżywalność komórek.

*Praca finansowana w ramach projektu zamawianego KBN (projekt nr K045/P05/2002).

Słowa kluczowe: naskórek, komórka macierzysta, namnażanie *in vitro*.

Summary: Human skin is an organ that is highly enriched in stem cells forming holoclones in *in vitro* cultures. They highly express $\beta 1$ - and $\alpha 6$ -integrins, p63 protein, Delta1 and β -catenin. Recently these cells acquire a lot of attention both in research and clinical trials because of their potential use in healing of burns and trophic ulcers. However keratinocytes expansions *ex vivo* from small biopsies are successful employed in the clinic, our knowledge of mechanisms that regulate a renewal and differentiation of skin stem cells is very limited. Thus aim of our studies was to isolate pure population of epidermal stem cells and expand it subsequently for clinical application. First we found that the c-kit antigen is a very useful tool to separate keratinocytes from melanocytes in primary cultures. Next, to identify surface markers that could be employed for isolation of skin stem cells we phenotype early keratinocytes with sets of different antibodies (against CXCR1, CD44H, c-met, $\alpha 3$ -,5-,6-integrin, FAS). Subsequently to isolate the fraction of early keratinocytes forming *in vitro* holoclones we stained isolated epidermal cells with antibodies against $\beta 1$ -integrin in the presence of Rh123. We observed that Rh123 dull $\beta 1$ -integrin bright cells are highly enriched in cells growing *in vitro* holoclones. Using this subpopulation of keratinocytes we evaluated a panel of growth factors and cytokines that could influence survival and expansion of early keratinocytes and limit their differentiation. Finally we tried to correlate our *in vitro* data with activation of several signaling pathways that are crucial for cell proliferation/survival.

Key words: epidermis, stem cell, *in vitro* expansion.

1. WSTĘP

Naskórek buduje wiele warstw komórek epitelialnych – keratynocytów, a ich proliferacja ma miejsce tylko w najgłębiej położonej warstwie bazalnej (podstawnej) naskórka. Tak więc odnawianie i różnicowanie wszystkich wyspecjalizowanych keratynocytów jest zależne od proliferacji subpopulacji komórek macierzystych w warstwie podstawnej naskórka. Wszystkie jego pozostałe warstwy składają się ze ściśle wyspecjalizowanych, zróżnicowanych komórek, niemających już zdolności do dalszych podziałów. Zaletą rekonstrukcji skóry z użyciem hodowanych autologicznych przeszczepów jest możliwość pozyskania, w wyniku hodowli, dużych płatów naskórka po pobraniu stosunkowo małych biopłatów skóry i trwałe pokrywanie za ich pomocą ubytków skóry, bez ryzyka odrzucania przeszczepu. Najwcześniejsze, aktywnie dzielące się autologiczne komórki naskórka hodowane *in vitro*, zachowują wysoki potencjał proliferacyjny po aplikacji klinicznej i wytwarzają ostatecznie w pełni funkcjonalny, zróżnicowany naskórek [7]. Celem badań szeregu zespołów jest opracowanie optymalnej metody pozyskiwania komórek macierzystych skóry i najbardziej wydajnej metody ich namnażania w hodowlach *in vitro*.

Komórki macierzyste są definiowane jako komórki mające nieograniczoną zdolność do samoodnawiania się i generowania potomnych komórek ściśle wyspecjalizowanych w wyniku procesu różnicowania. Subpopulacja komórek macierzystych naskórka podczas podziałów zachowuje stałą liczbę i daje początek populacji przejściowo namnażających się komórek (ang. *transient amplifying cells*), charakteryzującej się wysokim potencjałem proliferacyjnym w ograniczonym czasie, której komórki ostatecznie ulegają pełnemu zróżnicowaniu [9].

Nie wszystkie jednak keratynocyty rozrodczej warstwy naskórka są komórkami macierzystymi. Większość z nich to komórki przejściowo namnażające się, dzielące się tylko kilka razy i szybko różnicujące. W prawidłowym naskórku komórki macierzyste stanowią bowiem tylko od 1 do 10% komórek warstwy bazalnej [3,6].

Wykazano, że macierzyste komórki naskórka zlokalizowane są w trzech specyficznych regionach:

- (1) w przedziałach międzymieszkowych,
- (2) w górnym rejonie mieszka włosowego, w małym wybrzuszeniu, w okolicy ujścia gruczołu łojowego (ang. *bulges*) oraz
- (3) w macierzy germinalej mieszka włosowego [4,22,27,28].

Związek między tymi trzema niezależnymi przedziałami pozostaje niejasny, przypuszcza się natomiast, że rejon wybrzuszenia stanowi największą rezerwę komórek macierzystych skóry, które zdolne są do odtwarzania wielu struktur obecnych w skórze, m.in. mieszków włosowych, gruczołów łojowych. Komórki te są zatem pluripotencjalne i mają bardzo duży potencjał proliferacyjny, chociaż w stanie homeostazy *in vivo* znajdują się w swoich niszach w stanie uśpionym (ang. *quiescent*). Wydłużony cykl komórkowy, typowy dla subpopulacji komórek macierzystych, który determinuje bardzo rzadkie podziały tych komórek, minimalizuje prawdopodobieństwo błędów replikacyjnych i zabezpiecza ich wysoki potencjał proliferacyjny [8,19].

Hodowane *in vitro* komórki macierzyste naskórka, po usunięciu z nisz, w których się lokują w skórze, zachowują się odmiennie od komórek znajdujących się w naskórku w warunkach *in vivo*. Okazuje się bowiem, że populacja komórek macierzystych „uśpionych”, z bardzo wydłużonym cyklem podziałowym (ang. *quiescent*) *in vivo* charakteryzuje się największą aktywnością podziałową w hodowlach *in vitro*. Stosując znakowanie tych komórek *in vivo* radioaktywną tymidyną stwierdzono, że jej poziom w komórkach utrzymuje się przez wiele tygodni, natomiast po ich wyizolowaniu i umieszczeniu w hodowli *in vitro*, poziom radioaktywności szybko spada, ponieważ komórki te intensywnie proliferują [19].

W odróżnieniu od komórek macierzystych, komórki progenitorowe tworzące subpopulację przejściowo namnażających się keratynocytów aktywnie dzielą się *in vivo*, natomiast *in vitro* znacznie szybciej ulegają różnicowaniu.

Keratynocyty warstwy bazalnej dają początek klonom, co umożliwia zbadanie ich potencjału proliferacyjnego. Dzięki zastosowaniu analizy klonalnej wyizolowano z naskórka ludzkiego 3 typy klonów komórek, charakteryzujących się różnym potencjałem proliferacyjnym – holoklony, meroklony i paraklony [16]. Uważa się, że keratynocyty tworzące holoklony są właściwymi komórkami macierzystymi naskórka, ponieważ po pasażu dają początek takim samym siostrzanym klonom, które pod względem morfologii charakteryzują się regularnymi kształtami, a komórki, które wchodzi w ich skład, są małe i stanowią wysoce homogeną morfologicznie populację. Komórki izolowane z holoklonów potencjalnie mogą ulegać nawet 140 podziałom mitotycznym. Paraklony z kolei są tworzone przez przejściowo namnażające się komórki progenitorowe naskórka (ang. *transient amplifying cells*). Komórki w tych klonach dzielą się kilka razy i ostatecznie różnicują. Meroklony natomiast są tworzone przez pośredni typ komórek

i są rezerwuarem komórek przejściowo namnażających się. Różnicowanie komórek klonogennych, od tych tworzących holoklony przez meroklony do paraklonów, jest procesem nieodwracalnym. Przebiega on powoli w procesie starzenia naskórka *in vivo* i w trakcie pasażowania komórek *in vitro*. Jest to natomiast proces bardzo szybki przy niezachowaniu właściwych warunków hodowli komórek [2].

Prowadzone dotychczas badania nad antygenami powierzchniowymi występującymi na komórkach macierzystych naskórka ludzkiego nie doprowadziły jeszcze do zidentyfikowania molekularnego markera charakterystycznego tylko dla tej populacji komórek, który umożliwiłby ich selektywną izolację z heterogennej populacji proliferujących keratynocytów warstwy germinalnej. Identyfikacja komórek macierzystych naskórka jest retrospektywna – na podstawie analizy klonalnej. Duża liczba holoklonów w hodowli świadczy o wydajnej izolacji keratynocytów istotnie wzbogaconych we frakcję macierzystych komórek naskórka.

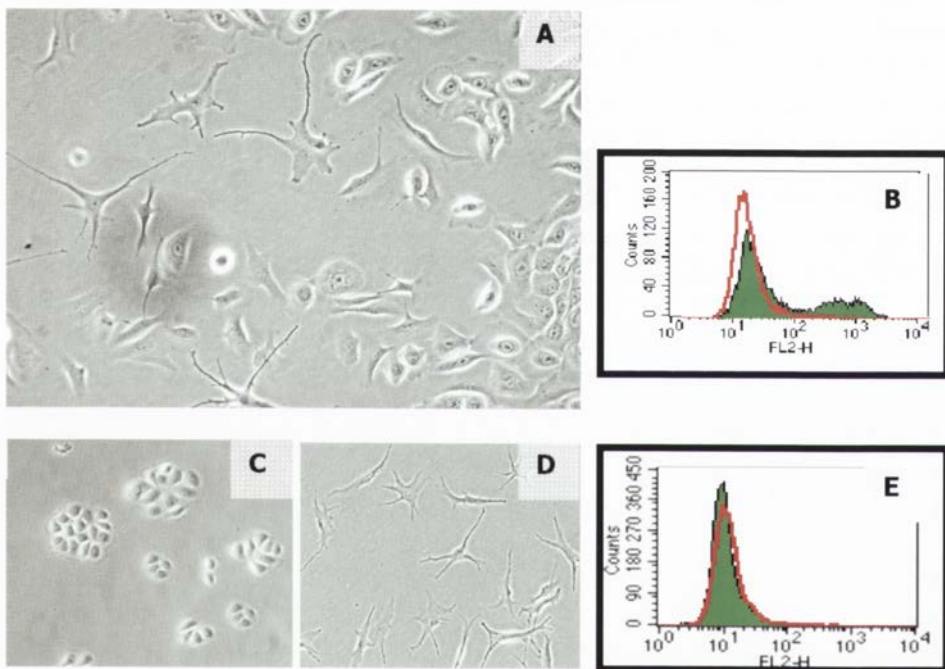
Uważa się jednak, że spośród wszystkich keratynocytów, komórki macierzyste naskórka cechują się najwyższą ekspresją β 1-integrzyn [1,6,29], α 6-integryny [10,21], czynnika transkrypcyjnego p63 [15,17] i Delta 1 [11,14,30], mają również wyższą ekspresję β -kateniny cytoplazmatycznej w stosunku do β -kateniny związanej z kadherynami błon komórkowych [24, 27], a także podwyższoną ekspresję cytokeratyny 19 [13].

Integrynom, jako receptorom białek macierzy zewnątrzkomórkowej, przypisuje się ogromne znaczenie w regulacji homeostazy skóry. Właściwości adhezyjne integrzyn utrzymują odpowiedni wzór rozmieszczenia komórek macierzystych w warstwie bazalnej naskórka i uważa się, że odgrywają one również istotną rolę w regulacji różnicowania keratynocytów. β 1-integryny występują na powierzchni wszystkich keratynocytów warstwy bazalnej naskórka, a więc także komórek macierzystych epidermy zlokalizowanych w charakterystycznych niszach. Proces opuszczania przedziału komórek macierzystych wiąże się z odłączeniem się komórek od błony podstawnej i stopniowym podjęciem migracji w kierunku powierzchniowych warstw skóry. Zmiany te związane są ze spadkiem ekspresji β 1-integryny [5]. Analiza klonogenna wykazała, że izolując komórki z najwyższą ekspresją β 1-integryny uzyskuje się frakcje wzbogacone w komórki macierzyste [12]. Komórki te są wciąż zanieczyszczone komórkami różnicującymi się. Wykazano również, że komórki te najszybciej przyczepiają się do podłoża pokrytego kolagenem IV lub lamininą (po 20 minutach). Ta właściwość może być wykorzystana do ich selekcji [6].

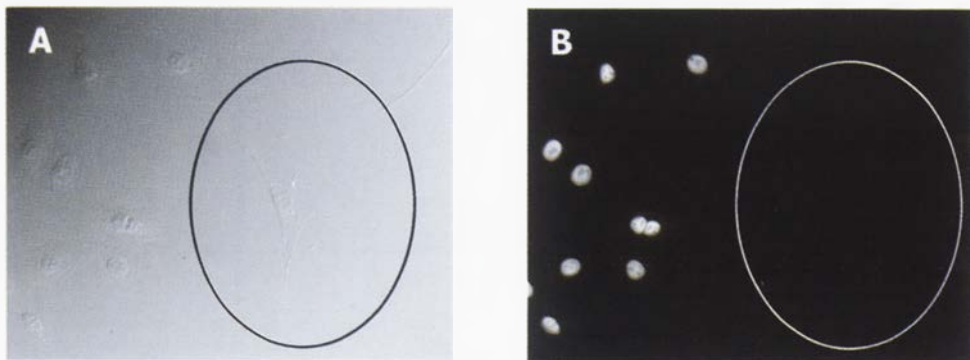
Czynnik transkrypcyjny p63 należy do rodziny, do której należą także p53 i p73. W naskórku ludzkim, mieszkach włosowych i uwarstwionej hodowli keratynocytów *in vitro*, białko p63 ulega ekspresji w jądrach komórek dzielących się lub zachowujących zdolność proliferacyjną [15]. Wyniki badań przeprowadzonych na keratynocytach mysich wykazały, że p63 ulega specyficznie ekspresji w najwcześniejszych keratynocytach tworzących holoklony. Nie stwierdzono natomiast jego obecności w komórkach przejściowo namnażających się tworzących paraklony [17]. Szczegółowe badania dowodzą jednak, że w trakcie różnicowania drastycznie spada poziom ekspresji tego białka. Obecne jest jednak ono jeszcze w komórkach przejściowych, tworzących meroklony. Wykazanie jego ekspresji w komórkach izolowanych z naskórka może być przydatne do identyfikacji komórek macierzystych naskórka.

2. OPTIMALIZACJA POZYSKIWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA

Warunkiem uzyskania jak największej liczby autologicznych komórek naskórka do przeszczepu jest izolacja odpowiedniej liczby komórek macierzystych oraz zwiększenie ich liczby w ściśle zdefiniowanych warunkach hodowli. Większość komórek izolowanych z pobieranych od pacjentów wycinków skóry, to zróżnicowane lub ulegające apoptozie keratynocyty. Ponieważ subpopulacje komórek progenitorowych naskórka mają decydujące znaczenie w procesie gojenia ran, chcąc wykorzystać keratynocyty hodowane *in vitro* w klinice należy stworzyć im warunki w hodowlach, które umożliwią optymalną proliferację i ograniczą jednocześnie różnicowanie. W pierwszej fazie izolacji komórek naskórka uzyskuje się wysoce heterogenną populację, w której występują keratynocyty wszystkich warstw naskórka, na różnych etapach różnicowania, a także melanocyty występujące w obrębie warstwy germinalnej. W prowadzonej przez kilka dni hodowli pierwotnej utrzymują się już jedynie keratynocyty zdolne do podziałów (z warstwy bazalnej) oraz melanocyty.



RYCINA 1. Ekspresja receptora kinazy tyrozynowej c-kit na komórkach izolowanych z naskórka ludzkiego w hodowli pierwotnej i wtórnej. (A) Hodowla pierwotna komórek izolowanych z naskórka ludzkiego – widoczne keratynocyty i melanocyty. (B) Ekspresja receptora c-kit na powierzchni komórek z hodowli pierwotnej naskórka. Na wykresie widoczne 2 subpopulacje komórek c-kit⁺ melanocyty i c-kit⁻ keratynocyty. Oczyszczone z pozytywnych pod względem ekspresji receptora c-kit melanocytów (D) komórki naskórka tworzą w hodowlach *in vitro* kolonie wtórne składające się wyłącznie z keratynocytów (C,E)



RYCINA 2. Komórki w hodowli pierwotnej naskórka ludzkiego (zaznaczono melanocyt). Wykorzystując metodę immunofluorescencyjną z zastosowaniem przeciwciał przeciwko białku p63 skoniugowanych z fluoresceiną, stwierdzono brak ekspresji tego białka w melanocytach. Białko to występuje natomiast w keratynocytach

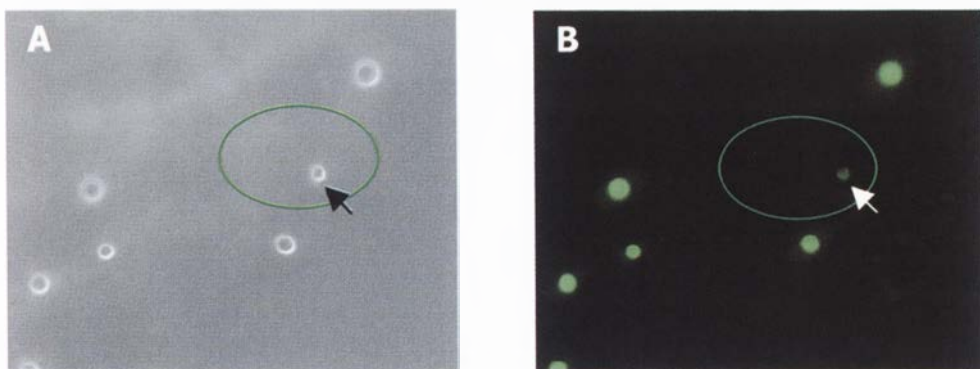
W przeprowadzonych badaniach własnych wykazaliśmy, że melanocyty mają na powierzchni receptor c-kit i usunięcie z izolowanej populacji komórek c-kit⁺ (marker melanocytów) pozwala na otrzymanie homogennej populacji keratynocytów, które tworzą w hodowlach *in vitro* wtórne kolonie pozbawione melanocytów (ryc. 1).

Uważamy więc, że receptor c-kit jest markerem umożliwiającym usunięcie melanocytów podczas sortowania czystej populacji keratynocytów.

Jak już wspomniano, białko p63 jest czynnikiem transkrypcyjnym charakterystycznym dla najwcześniejszych keratynocytów tworzących holoklony [17]. Prowadzone przez nas analizy fluorescencyjne ekspresji tego białka w izolowanych komórkach wykazały, że melanocyty nie wykazują ekspresji tego czynnika. Może więc ono również być przydatne do sortowania wczesnych keratynocytów z zanieczyszczonej melanocytami populacji komórek naskórka (ryc. 2).

Jak wcześniej wspomniano, komórki macierzyste *in vivo* cechuje stan uśpienia metabolicznego manifestujący się wydłużonym cyklem podziałowym i niską aktywnością. Cechy te, podobnie jak w przypadku ludzkich hematopoetycznych komórek macierzystych, mogą być wykorzystane w próbach zagęszczenia populacji macierzystych komórek skóry z wykorzystaniem barwnika metabolicznego rodaminę 123 (Rh123). Jak wiadomo, hematopoetyczne komórki macierzyste słabo gromadzą Rh123 [20]. Rh123 jest fluorochromem, który barwi aktywne mitochondria i jest usuwany z komórek za pomocą tzw. pompy oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance efflux pump*). W naszych badaniach założyliśmy, że komórki macierzyste naskórka mogą wykazywać podobne właściwości. Wykorzystaliśmy więc barwienie Rh123 jako jeden z markerów metabolicznych służących do sortowania powyższych komórek (ryc. 3).

Bezpośrednio po enzymatycznej izolacji keratynocytów z naskórka ludzkiego, część z nich poddano inkubacji w obecności Rh123. Pozostałe komórki inkubowano w obecności przeciwciał przeciwko β 1-integrynie znakowanych fluorescencyjnie.

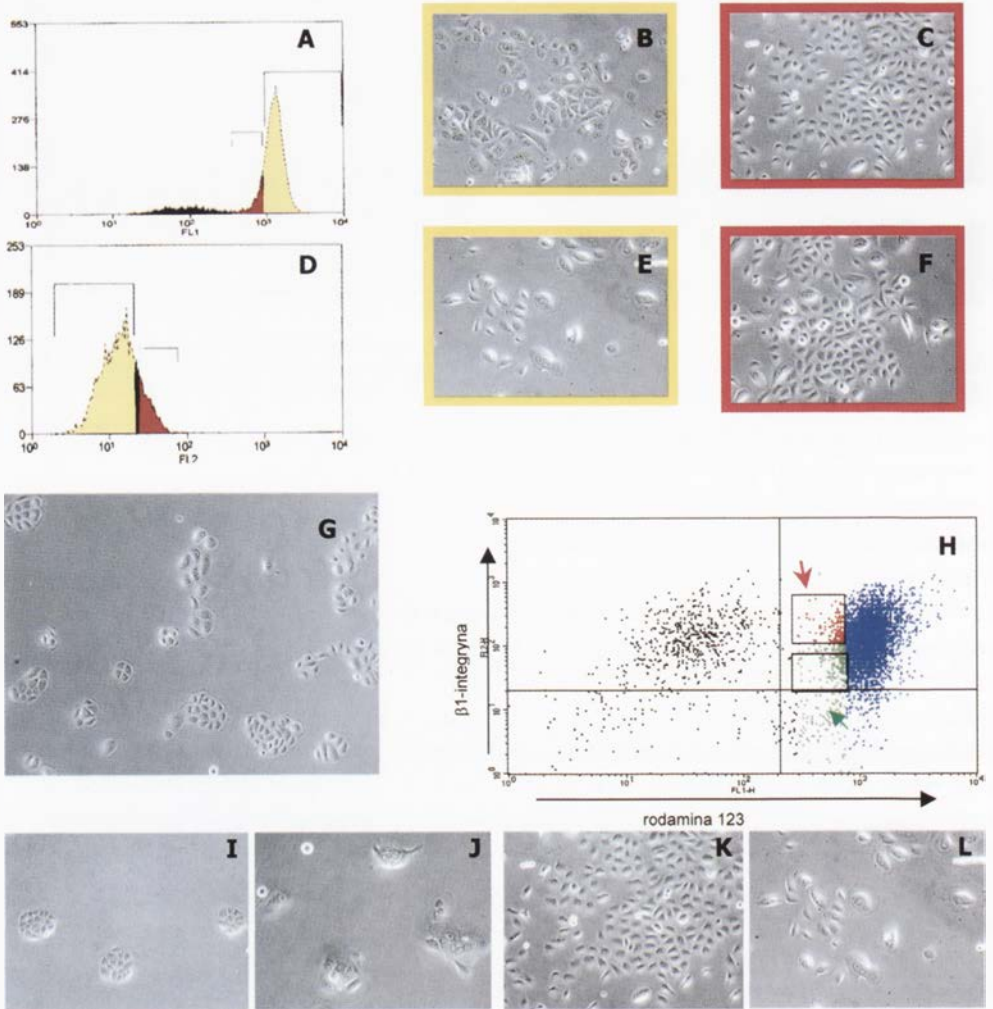


RYCINA 3. Keratynocyty bezpośrednio po izolacji poddane inkubacji z barwnikiem metabolicznym – rodaminą 123. Zaznaczona komórka wykazująca słabą fluorescencję cechuje niską akumulację rodaminę 123. Komórka ta jest prawdopodobnie najwcześniejszą komórką naskórka

Następnie sortowano komórki obu populacji przy użyciu sortera komórkowego, arbitralnie ustalając (ryc. 4 A i D) subpopulacje charakteryzujące się odpowiednio najniższą akumulacją Rh123 i wysoką ekspresją β 1-integryny. Sortowane komórki poddano następnie namnażaniu *in vitro*. Stwierdzono, że zarówno komórki naskórka, które słabo gromadzą Rh123, jak i mające silną ekspresję β 1-integryny wzbogacone są w komórki macierzyste keratynocytów, o czym świadczy zarówno ich morfologia, jak i aktywność proliferacyjna (4 C i F), istotnie różniąca się od pozostałych subpopulacji, wysortowanych na podstawie przeciwnych cech (4B i E). Populacja hodowanych *in vitro* keratynocytów wysortowanych na podstawie wysokiej ekspresji β 1-integryny, wzbogacona jest w komórki tworzące holoklony. Obserwuje się także domieszkę komórek tworzących paraklony (ryc. 4G). Aby zawęzić pole poszukiwań najwcześniejszych komórek naskórka, wykonaliśmy podwójne barwienie wczesnych keratynocytów na obecność β 1-integryny (CD29) i gromadzenie Rh123 (ryc. 4H). Komórki słabo gromadzące Rh123 i wykazujące wysoką ekspresję β 1-integryny pokazane są w górnym prawym kwadrancie – w polu zaznaczonym czerwoną strzałką. Stwierdziliśmy, że komórki te po wysortowaniu i umieszczeniu w hodowlach *in vitro* obdarzone są znacznym potencjałem proliferacyjnym (tworzą holoklony) oraz zdolnością samoodnawiania – cechami charakterystycznymi dla komórek macierzystych naskórka.

3. INNE POTENCJALNE MARKERY POWIERZCHNIOWE Wczesnych KERATYNOCYTÓW

Dotychczas proponowane markery powierzchniowe wczesnych keratynocytów (β 1-integryna, α 6-integryna) nie występują wyłącznie na komórkach macierzystych naskórka. Ich obecność stwierdza się także na wszystkich komórkach warstwy rozrodczej. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania molekuł powierzchniowych, specyficznych dla komórki macierzystej naskórka.



RYCINA 4. Sortowanie komórek wczesnych z heterogennej populacji keratynocytów ludzkich. B, C – zdjęcia komórek wysortowanych na podstawie ekspresji rodaminą 123 (wykres A) E, F – zdjęcia komórek wysortowanych na ekspresji $\beta 1$ -integryny (wykres D). (G) Keratynocyty w hodowli wtórnej tworzą różne pod względem morfologicznym typy klonów formowane przez komórki na różnym etapie różnicowania. (H) Cytogram wczesnych keratynocytów barwionych rodaminą 123 i przeciwciałem monoklonalnym przeciwko ludzkiej $\beta 1$ -integrynie (CD29). Populacja komórek zaznaczona strzałką i kolorem czerwonym jest wzbogacona w komórki macierzyste naskórka, charakteryzujące się wysoką ekspresją $\beta 1$ -integryny i niską akumulacją rodaminą 123, i po wysortowaniu tworzy typowe holoklony – po 2 dniach w hodowli (I) oraz charakteryzuje się wysokim potencjałem proliferacyjnym – po 7 dniach hodowli (K). Populacja komórek zaznaczona strzałką zieloną (niska akumulacja rodaminą 123 i niska ekspresja $\beta 1$ -integryny) to keratynocyty tworzące meroklony (J) i cechujące się ograniczonym potencjałem proliferacyjnym (L)

W przeprowadzonych badaniach ocenialiśmy ekspresję wybranych białek receptorowych i molekuł adhezyjnych na powierzchni wczesnych keratynocytów, stosując odpowiednie przeciwciała skonjugowane z fluorochromami, skierowane przeciwko powyższym markerom. Wyniki wstępnych eksperymentów przedstawiono w tabeli 1. Planuje się użycie niektórych z tych markerów w kombinacji z Rh123 do sortowania frakcji keratynocytów wzbogaconej w komórki macierzyste (tab. 1).

4. OPTIMALIZACJA NAMNAŻANIA WCZESNYCH KOMÓREK NASKÓRKA

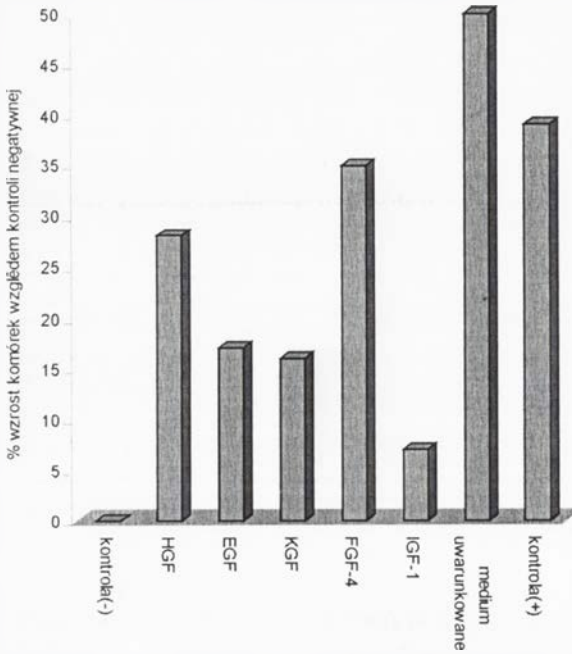
TABELA 1. Ekspresja wybranych molekuł we wczesnych keratynocytach wysortowanych na podstawie arbitralnie ustalonej wysokiej ekspresji β 1-integryny

β 1-integryna	+
β 2-integryna	-
α 3-integryna	+
α 4-integryna	+
α 5-integryna	+
α 6-integryna	+
CD44H	+
c-met	+
c-kit	-
FLT3	-
CXCR1	+
CXCR4	-
FAS	+
TNF-R1	-

Uzyskanie optymalnych warunków hodowli najwcześniejszych komórek naskórka wiąże się z zastosowaniem najlepszej kombinacji czynników stymulujących proliferację keratynocytów i hamujących ich różnicowanie. W warunkach *in vivo*, w otoczeniu komórek macierzystych naskórka w obrębie macierzy międzykomórkowej, występuje szereg czynników, które utrzymują komórki naskórka w stanie niezróżnicowanym lub odpowiednio ukierunkowują ich różnicowanie. Są to głównie czynniki wzrostu produkowane przez fibroblasty obecne w skórze właściwej.

Dotychczas dostępne bezsurowicze media do hodowli keratynocytów są wzbogacane wyciągiem z przysadki bydłowej, będącym niezdefiniowaną mieszaniną czynników wzrostu i substancji biologicznie aktywnych. Celowe wydaje się opracowanie oryginalnej kombinacji rekombinowanych czynników, które warunkowałyby optymalne namnażanie wczesnych, niezróżnicowanych komórek naskórka. Kluczowe znaczenie będzie miało zidentyfikowanie odpowiednich czynników wzrostowych odpowiedzialnych za namnażanie wczesnych komórek naskórka. W naszych badaniach ocenimy również wpływ czynników uwalnianych przez fibroblasty i melanocyty, które potencjalnie mogą modulować proliferację wczesnych keratynocytów.

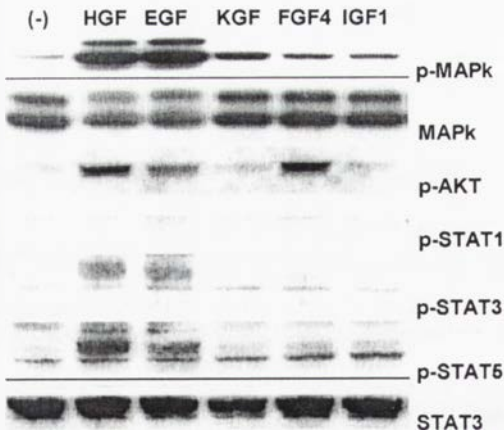
W dotychczasowych eksperymentach zbadaliśmy wpływ kilku wybranych cytokin na proliferację tych komórek. Stwierdzono m.in., że FGF-4 (czynnik wzrostu fibroblastów 4), KGF (czynnik wzrostu keratynocytów), EGF (epidermalny czynnik wzrostu), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów) stymulują wzrost wczesnych keratynocytów. Stwierdziliśmy poza tym, że nadsącza z hodowli fibroblastów skóry znacznie podnoszą aktywność proliferacyjną wczesnych komórek naskórka. Rozpoczęliśmy także badanie wpływu cytokin z rodziny IL6 na proliferację tych komórek. Na szczególną uwagę zasługuje onkostatyna M, która silnie stymuluje wzrost komórek (ryc. 5).



RYCINA 5. Wpływ wybranych czynników wzrostowych na proliferację wczesnych keratynocytów oceniany za pomocą mitochondrialnego testu metabolicznego. Zwraca uwagę korzystny wpływ EGF, HGF, a przede wszystkim medium uwarunkowanego 24-godzinna inkubacją w hodowli fibroblastów skóry ludzkiej na wzrost keratynocytów

Poznanie wpływu czynników zewnętrznych na komórkę wymaga zbadania wewnątrzkomórkowych reakcji na ich obecność w środowisku. Analizie poddaje się ścieżki sygnalizacyjne biegnące od poszczególnych receptorów, ich wzajemne przenikanie i krzyżowanie się. W przeprowadzonych doświadczeniach zbadaliśmy wpływ cytokin użytych w analizie proliferacji na aktywację wybranych ścieżek transdukcji sygnału we wczesnych keratynocytach. Wykazaliśmy m.in., że HGF, FGF4 i KGF stymulują p44/42 MAPK i p38 MAPK, a HGF, EGF FGF-4 stymulują oś PI-3K-AKT w tych komórkach.

Sprawdziliśmy również aktywację ścieżek JAK-STAT i stwierdziliśmy, że HGF i EGF silnie aktywują białka STAT 3, 5 i 6. Badania



RYCINA 6. Wpływ wybranych czynników wzrostowych na aktywację wybranych ścieżek transdukcji sygnału we wczesnych keratynocytach. Komórki wyciszone w wyniku hodowli w pożywce bez czynników wzrostu(-) stymulowano za pomocą HGF, EGF, KGF, FGF-4, IGF-1.

te mają charakter pionierski, ponieważ zostały przeprowadzone na najwcześniejszych ludzkich komórkach prawidłowego naskórka sortowanych na podstawie akumulacji rodaminy 123.

Jak wiadomo, procesy związane z żywotnością i proliferacją i apoptozą komórek regulowane są przez sygnały generowane w wyniku pobudzenia receptorów powierzchniowych komórki przez czynniki troficzne. Dlatego też zidentyfikowanie tych ścieżek może mieć kluczowe znaczenie w próbach farmakologicznej modulacji tych procesów (ryc. 6).

PODSUMOWANIE

Dotychczas nie opracowano metod, które umożliwiłyby jednoznacznie wysortować czystą populację komórek macierzystych naskórka spośród zawiesiny komórek uzyskiwanych podczas trawienia enzymatycznego. Zaproponowana przez nas strategia izolacji komórek mających wysoką ekspresję $\beta 1$ -integryny i słabo gromadzących Rh123 jest ważnym krokiem do opracowania takiej metody.

Celem prowadzonych badań jest identyfikacja pod względem fenotypowym komórek macierzystych naskórka, poznanie ich antygenów powierzchniowych, które umożliwią następnie izolację na potrzeby kliniczne i doświadczalne. Sortowanie najwcześniejszych komórek naskórka w połączeniu z unikalnymi technikami badania ekspresji genów (chipy Affymetrix) pozwoli na zbadanie zmian w ekspresji genów biorących udział w proliferacji i hamowaniu apoptozy komórek macierzystych naskórka.

Poznanie wielu zasygnalizowanych powyżej zagadnień umożliwi opracowanie doskonalszych metod identyfikacji, oczyszczania i sterowania zachowaniem się komórek macierzystych skóry. Badania te mają bezpośrednie implikacje kliniczne w leczeniu chorych z oparzeniami i owrzodzeniami troficznymi.

LITERATURA

- [1] BAGUTTI C, HUTTER C, CHIQUET-HRISMANN R, FASSER R, WATT FM. Dermal fibroblast-derived growth factors restore the ability of $\beta 1$ -integrin-deficient embryonal stem cells to differentiate into keratinocytes. *Develop Biol* 2001; **231**: 321–333.
- [2] BARRANDON Y, GREEN H. Three clonal types of keratinocytes with different capacities of multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2302–2306.
- [3] BIANCO P, ROBEY P. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; **414**: 118–121.
- [4] COTSARELIS G, SUN TT, LAVKER RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 1990; **61**: 1329–1337.
- [5] JENSEN UB, LOWELL S, WATT FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 1999; **126**: 2409–2418.
- [6] JONES PH, HARPER S, WATT FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 1995; **80**: 83–93.
- [7] KOLODKA TM, GARLICK JA, TAICHMAN LB. Evidence for keratinocyte stem cells *in vitro*: Long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4356–4361.

- [8] LAVKER RM, SUN TT. Epidermal stem cells: Properties, markers, and location. *PNAS* 2000; **97**: 13473–12475.
- [9] LEHRER MS, SUN TT, LAVKER RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998; **111**: 2867–2875.
- [10] LI A, SIMMONS PJ, KAUR P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3902–3907.
- [11] LOWELL S, JONES P, LeROUX I, DUNNE J, WATT FM. Stimulation of human epidermal differentiation by Delta-Notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 2000; **10**: 491–500.
- [12] MATHOR M, FERRARI J, DELLAMBRA E, CILLI M, MAVILIO F, CANCEDDA R, DE LUCA M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10371–10376.
- [13] MICHEL M, TOROK N, GODBOUT MJ, LUSSIER M, GAUDREAU P, ROYAL A, GERMAIN L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1017–1028.
- [14] NIEMANN K, WATT FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends in Cell Biol* 2002; **12**: 185–192.
- [15] PARSA R, YANG A, McKEON F, GREEN H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; **113**: 1099–105.
- [16] PELLEGRINI G, BONDANZA S, GUERRA L, DE LUCA M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**: 778–790.
- [17] PELLEGRINI G, DELLAMBRA E, GOLISANO O, MARTINELLI E, FANTOZZI I, BONDANZA S, PONZIN D, MCKEON F, DE LUCA M. p63 identifies keratinocyte stem cells. *PNAS* 2001; **98**: 3156–3161.
- [18] POTTEN CS, BOOTH C. Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol* 2002; **119**: 888–899.
- [19] POTTEN CS, MORRIS RJ. Epithelial stem cells *in vivo*. *J Cell Sci* 1988; **10**: 45–62.
- [20] RATAJCZAK MZ, PLETCHER CH, MARLICZ W, MACHALINSKI B, MOORE J, WASIK M, RATAJCZAK J, GEWIRTZ AM. CD34+, kit+, rhodamine123(low) phenotype identifies a marrow cell population highly enriched for human haematopoietic stem cells. *Leukemia* 1998; **12**: 942–950.
- [21] TANI H, MORRIS RJ, KAUR P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *PNAS* 2000; **97**: 10960–10965.
- [22] TAYLOR G, LEHRER MS, JENSEN PJ, SUN TT, LAVKER RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; **102**: 451–461.
- [23] TOMIC-CANIC M, KOMINE M, FREEDBERG IM, BLUMENBERG M. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 1998; **17**: 167–181.
- [24] WAIKEL RL, KAWACHI Y, WAIKEL P, WANG XJ, ROOP DR. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nature* 2001; **28**: 165–168.
- [25] WATT FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO* 2002; **21**: 3919–3926.
- [26] WATT FM. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Gen & Develop* 2001; **11**: 410–417.
- [27] WATT FM. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci* 2002; **28**: 173–180.
- [28] WATT FM, HOGAN BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; **287**: 1427–1430.
- [29] ZHU AJ, HAASE I, WATT FM. Signalling via $\beta 1$ integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 6728–6733.
- [30] ZHU AJ, WATT FM. β -catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 1999; **126**: 2285–2298.

Adres autora: 30-386 Kraków, ul. Gronostajowa 7
e-mail: Justyna@mol.uj.edu.pl

OCENA UDZIAŁU KOMÓREK MACIERZYSTYCH CZŁOWIEKA W REGENERACJI MIĘŚNIA SZKIELETOWEGO – BADANIA NA MODELU MYSIM*

PARTICIPATION OF HUMAN STEM CELLS IN REGENERATION
OF SKELETAL MUSCLES –THE MOUSE MODEL

Iwona GRABOWSKA, Władysława STREMIŃSKA, Jerzy MORACZEWSKI,
Krzysztof MACHAJ, Danuta WASILEWSKA, Jerzy KAWIAK

Streszczenie: Zdolność myszy SCID do przyjmowania przeszczepów ksengenicznych, pozwala na badanie udziału ludzkich komórek macierzystych w regeneracji tkanek. Regeneracja mięśni szkieletowych jest dobrym modelem do badań nad zaangażowaniem komórek macierzystych w ten proces. Regeneracja mięśni szkieletowych zależy od obecności komórek satelitowych (komórek prekursorowych mięśni). Oprócz nich w regeneracji mogą uczestniczyć komórki macierzyste pochodzące z innych tkanek. Celem projektu jest zbadanie, jaki może być udział komórek macierzystych w regeneracji w układzie ksengenicznym. Opisano przebieg regeneracji mięśni myszy SCID oraz pokazano wstępne wyniki podawania im ludzkich komórek macierzystych z krwi pępowinowej.

Słowa kluczowe: regeneracja, komórki macierzyste, mięśnie szkieletowe.

Summary: SCID mice have ability to accept ksenogenic grafts. It let us to investigate participation of human stem cells in tissue regeneration. Regeneration of skeletal muscle is a good model for examining the participation of cells which take part in this process. Regeneration of skeletal muscle depends on presence of the satellite cells (muscle progenitor cells). Except them, stem cells from different tissues can be involved in the regeneration. The target of the project is investigate of the participation of stem cells in regeneration in ksenogenic system. Regeneration of skeletal muscle of SCID mice was described. Also preleminary results of experiment consisting in injection human stem cells from cord blood into SCID mice were described.

Key words: regeneration, stem cells, skeletal muscle.

WSTĘP

Myszy SCID (*Severe combined immunodeficient*) z niedoborem immunologicznym przyjmują przeszczepy ksenogeniczne, między innymi przeszczepy komórek człowieka [8]. Pozwala to na poszukiwanie miejsc osiedlania się przeszczepionych ludzkich komórek macierzystych w organizmie myszy i badanie udziału tych komórek w procesach regeneracji tkanek.

Mięśnie szkieletowe mają zdolność do regeneracji po uszkodzeniu. Proces ten zależy od niewielkiej populacji komórek nazywanych komórkami satelitowymi. Komórki satelitowe, to subpopulacja embrionalnych mioblastów (komórek niezróżnicowanych), znajdujących się między błoną podstawną a sarkolemmą włókien mięśniowych. Wyróżniono wśród nich komórki odpowiedzialne za wzrost i komórki odpowiedzialne za regenerację mięśni. Komórki satelitowe w hodowlach *in vitro* około czwartego dnia od wysiania wchodzi w fazę intensywnych podziałów. Po dwóch dniach zaczynają ustawiać się w szeregi i fuzjować w małe dwu-, trójjądrowe miotuby. Kolejnym etapem jest uformowanie dużych wielojądrowych miotub zdolnych do spontanicznych skurczów [4].

Regeneracja mięśni szkieletowych wydaje się dobrym modelem do badań nad zaangażowaniem komórek macierzystych w różnicowanie tkanek osobników dorosłych. Eksperymentalnie kontrolowane zniszczenie tkanki mięśnia szkieletowego (miażdżenie, zamrażanie, traktowanie toksynami) stosowano z sukcesami w badaniach nad biologią komórki [9]. Uszkodzenie mechaniczne mięśnia powoduje zniszczenie błony komórkowej, napływ jonów wapnia i degradację białek mięśniowych. Następnie pojawiają się komórki stanu zapalnego i fibroblasty. Kolejnym etapem jest aktywacja komórek satelitowych. Po aktywacji i intensywnych podziałach mioblasty zaczynają fuzjować i formują miotuby. Następnie odtwarzana jest architektura mięśnia i przywracana jego funkcja [1].

Oprócz progenitorowych komórek mięśniowych (komórki satelitowe) w regeneracji mięśni szkieletowych mogą uczestniczyć komórki pochodzące z innych źródeł np. komórki śródbłonna [2]. W ten proces mogą być również zaangażowane komórki macierzyste szpiku kostnego [3].

Udział komórek macierzystych w stresie w układzie allogenicznym był wstępnie badany [5,6,7]. Nie jest wykluczone, że podobny proces ma miejsce w układzie ksenogenicznym. Aby taką możliwość sprawdzić, zaplanowano opisane niżej eksperymenty, w których komórki macierzyste krwi pępowinowej człowieka podawano myszy SCID z uszkodzonym mięśniami szkieletowymi.

MATERIAŁY I METODY

Myszy SCID. Do doświadczeń wykorzystano myszy wyprowadzone przez 10 pokoleń z jednej pary myszy C.B.-17 scid/scid kongenicznych z BALB/c (HARLAN, Shaw's Farm, England). Myszy są prowadzone w jałowym pomieszczeniu, w klatkach jałowych z filtrami, na jałowej karmie z dodatkiem odpowiednich witamin. Wszystkie zabiegi na myszach były prowadzone zgodnie z zaleceniami i za zgodą Komisji Etycznej Zwierząt (Komisja no 1). Zwierzęta doświadczalne były w wieku 2–3 miesięcy. Myszy otrzymywały komórki macierzyste dootrzewnowo bądź do uszkodzonego mięśnia. Uszkodzenie wybranego mięśnia było prowadzone przez zmiżdżenie po odnerwieniu w narkozie. Po różnym okresie od zabiegu myszy zabijano i pobierano tkanki (patrz opis dalej).

Mięśnie kończyny tylnej trzy miesięcznych myszy SCID lub myszy BALB/c

- mięsień mieszaný (zawiera włókna wolno i szybko kurczące się) *Gastrocnemius (musculus gastrocnemius)*,
- mięsień szybko kurczący się *EDL (musculus extensor digitorum longus)*,
- mięsień wolno kurczący się *Soleus (musculus soleus)*.

Komórki macierzyste. Komórki były otrzymywane ze świeżo urodzonego łożyska. W wyjściowych doświadczeniach komórki były znakowane *in vitro* błonowym znacznikiem PKH67 (Sigma). W innych doświadczeniach podawano komórki nieznakowane, by następnie odnajdować je w tkankach reakcjami immunocytochemicznym. Liczba podawanych komórek macierzystych wynosiła 10^6 .

Przebieg hodowli. Komórki satelitarne izolowano z mięśni przy pomocy 0,15% pronazy. Komórki pochodzące z *m.gastrocnemius*, *m.soleus* i *m.edl* myszy hodowano w środowisku DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i 10% surowicy końskiej oraz antybiotyku. Zdjęcia komórek w hodowli wykonano przy użyciu mikroskopu Eclipse TE-200/300 firmy Nikon z kontrastem modulacyjnym Hoffmana przy użyciu programu ACT-1.

Mrożenie mięśni szkieletowych i barwienie skrawków. Myszy zabijano, a następnie mięśnie izolowano, zamrażano w ciekłym izopentanie i wykonano barwienia. Zamrożone mięśnie cięto na skrawki grubości 10 μm w mikrotomie mrozeniowym. Następnie skrawki barwiono (hematoksylina/eozyna lub hematoksylina/trichrom Gomoriego) i zamykano w środowisku wodnym.

Analizy preparatów dokonano w mikroskopie fluorescencyjnym, przy użyciu programu CamWare. Otrzymane zdjęcia opracowano w programie Adobe Photoshop.

Podawanie ludzkich komórek macierzystych myszom SCID. Wykonano trzy serie doświadczeń:

- Komórki macierzyste człowieka podano dootrzewnowo (10^6 komórek), po tygo dniu od transplantacji myszy poddano operacjom. Mięśnie regenerowały 7 dni.
- Komórki macierzyste człowieka podano myszom SCID domięśniowo (10^6).
- Komórki macierzyste człowieka podano myszom SCID domięśniowo (dwa warianty po 500 tys. i po 1mln komórek na mięsień) zaraz po zmiżdżeniu mięśnia.

Mięśnie regenerowały 7 dni.

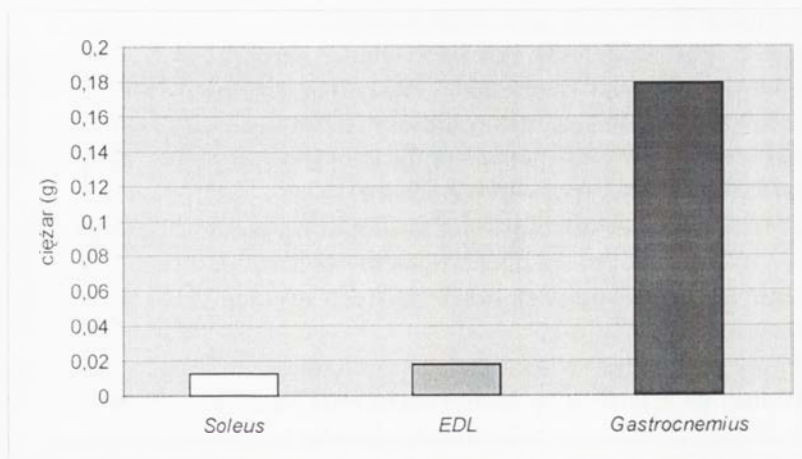
Pozyskiwanie materiału do badań. Krew pępowinową pozyskiwano podczas porodów terminowych. Po odpepnieniu dziecka tętnicę pępowinową nakłuwno igłą typowego zestawu kolekcyjnego (Baxter), ze zredukowaną do 23 ml objętością cytrynianu. Do doświadczeń wykorzystywano porcje krwi o objętości wahającej się w granicach 30–50 ml.

Badanie składu komórkowego krwi. Analizę komórkową krwi pępowinowej, na poszczególnych etapach jej preparatyki, wykonywano przy użyciu półautomatycznego analizatora hematologicznego Sysmex 820 (Kobe, Japan) określając liczbę krwinek białych, odsetek komórek jednojądrzastych, hematokryt oraz liczbę krwinek czerwonych i płytkowych..

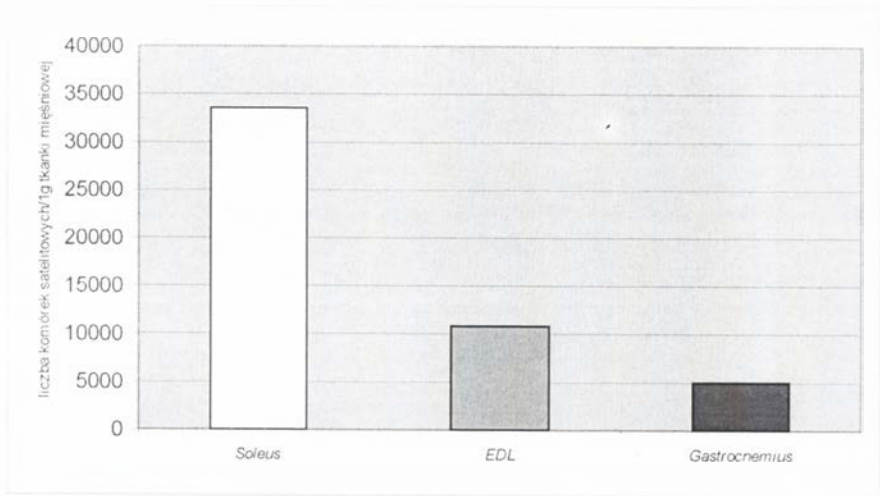
Izolacja frakcji komórek jednojądrzastych. Pozyskaną krew pępowinową rozcieńczano w stosunku 1:2 PBS-em (Gibco) i nakładano na mieszaninę Ficoll (Gibco) /uropolina (Polpharma S.A.) o gęstości $d = 1,077$ g/ml. Probówki z tak przygotowaną krwią wirowano przez 40 min, z prędkością $400 \times g$, w temperaturze 22°C . Powstałą interfazę przenoszono jałową pipetą pasteurowską do czystej probówki, gdzie usuwano ficoll/uropolinę przez dwukrotne płukanie komórek w podłożu hodowlanym Iscove'a (Gibco), po czym zawieszano je w podłożu Iscove'a z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej (FCS, Pan Biotech).

Znakowanie komórek. Frakcję komórek jednojądrzastych barwiono znacznikiem błonowym PKH67 (Sigma) wg procedury zalecanej przez producenta. Zawiesinę komórek doprowadzano do gęstości $2 \times 10^7/\text{ml}$ i mieszano z równoważną objętością PKH67 o stężeniu 4×10^{-6} M. Po zakończeniu barwienia zawiesinę komórek płukano trzykrotnie i analizowano pod względem żywotności i poziomu świecenia. Żywotność komórek wynosiła średnio 80%. Nie stwierdzono niespecyficznego świecenia tła.

Reakcja z przeciwciałami. Skrawki utrwalono w 3% paraformaldehydzie (PFA). Reszty aldehydowe pochodzące z PFA blokowano 0,25% glicyną w PBS (1 h, temp.



Wykres 1.

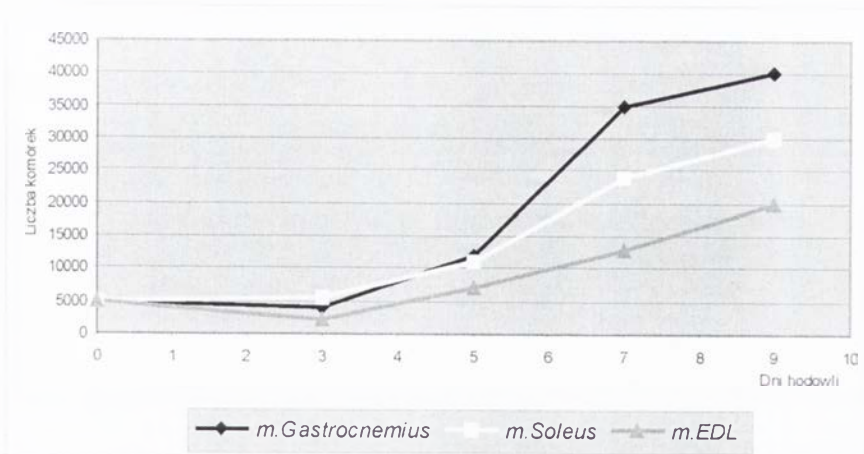


Wykres 2

pokoju). Miejsca niespecyficznego wiązania się przeciwciał blokowano w 3% BSA w PBS. Zastosowano następującą kombinację przeciwciał (rozcieńczenia 1:100 w 3% BSA w PBS, inkubacja 3 h, temp. pokojowa lub na noc 4°C):

Rat anti-human CXCR4 (Pharmingen),
 Anty rat IgG (VECTOR).

Na każdym etapie preparaty płukano w PBS z 0,1% Tween-20. Do dalszej procedury znakowania użyto zestawu VECTASTAIN ABC-AP Standard (VECTOR) i substratu dla alkalicznej fosfatazy (Alkaline Phosphatase Substrate Kit III VECTOR).



Wykres 3

WYNIKI

1. Ocena liczby i charakterystyka komórek satelitowych mięśni szkieletowych myszy SCID

Mięśnie tuż po wycięciu ważono, a następnie poddawano procedurze izolacji komórek satelitowych. Celem takiej oceny było wybranie właściwego mięśnia do doświadczeń nad regeneracją mięśni u myszy SCID. Mięśnie *Soleus* i *EDL* są stosunkowo małymi mięśniami o zbliżonej masie (*Soleus* ok. 0,013 g, a *EDL* ok. 0,0175 g – średnia masa 15 mięśni). *Gastrocnemius* waży średnio 0,179 g, jest więc znacznie większy niż dwa poprzednio wspomniane mięśnie (wykres 1).

Mięśnie poddawano procedurze izolacji komórek satelitowych metodą opracowaną w Zakładzie Cytologii Wydziału Biologii UW. Po wyizolowaniu komórki liczone i wysiewano. Wykres 2 zawiera porównanie badanych mięśni pod względem ilości komórek satelitowych w 1g tkanki mięśniowej. Najwięcej komórek satelitowych na 1g tkanki mięśniowej zawiera *Soleus* (średnia dla 15 mięśni – 33 482 komórki satelitowe w 1g tkanki mięśniowej). *EDL* i *Gastrocnemius* zawierają znacznie mniej komórek satelitowych (średnia dla 15 mięśni: *EDL* – 10 787, *Gastrocnemius* – 5000 komórek satelitowych w 1g tkanki mięśniowej).

Wyznaczono również krzywe wzrostu *in vitro* dla komórek satelitowych pochodzących z badanych mięśni. Komórki satelitowe pochodzące ze wszystkich trzech mięśni wchodzi w fazę wzrostu około piątego dnia hodowli (ryc. 1A). Następnie około siódmego dnia hodowli zaczynają się różnicować i fuzjować w małe dwu- lub trójjądrowe miotuby (ryc. 1B). Kolejnym etapem różnicowania było utworzenie wielojądrowych miotub (ryc. 1C). Komórki z mięśnia *Gastrocnemius* rosną najszybciej i są najliczniejsze w dziewiątym dniu hodowli. Komórki pochodzące z *EDL* rosną najslabiej (wykres 3).

Do badań nad regeneracją mięśni i udziałem ludzkich komórek macierzystych w regeneracji mięśni myszy SCID wybrano mięsień *Gastrocnemius*. Mięsień ten jest duży, co pozwala na swobodne manipulacje podczas operacji i transplantacji, które muszą się odbywać w warunkach sterylnych.

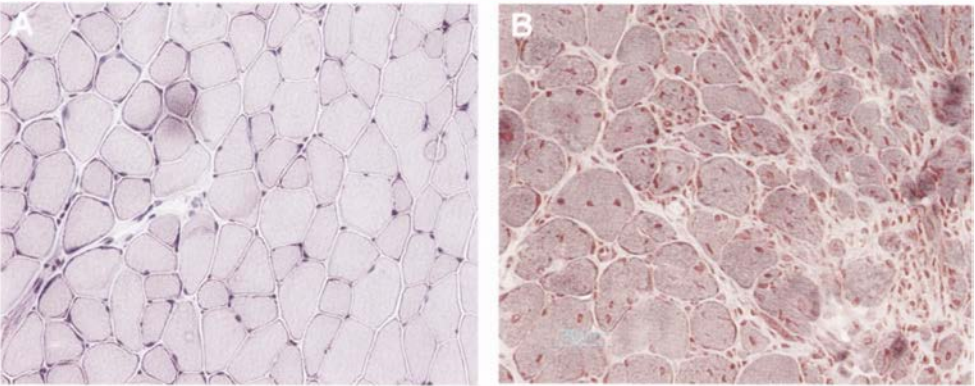
2. Analiza morfologiczna mięśnia szkieletowego i regeneracji mięśni szkieletowych u myszy kontrolnych (BALB/c) i myszy SCID

Regeneracja mięśnia szkieletowego przebiega z udziałem komórek satelitowych, które znajdują się między błoną podstawną a sarkolemmą włókna mięśniowego. Celem tego etapu doświadczenia było zbadanie morfologii i porównanie przebiegu regeneracji mięśni myszy kontrolnych (BALB/c) i myszy SCID.

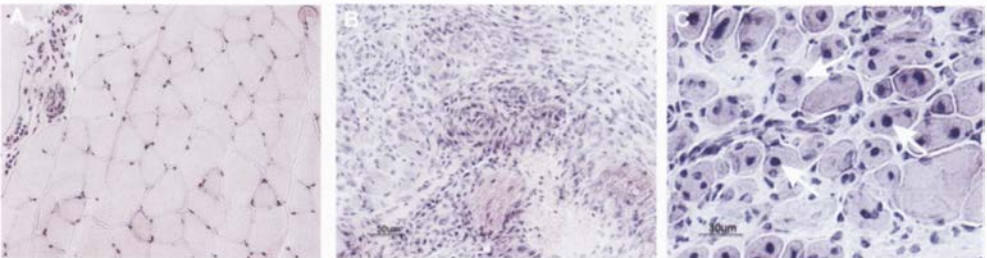
Pierwszym etapem doświadczenia była obserwacja regeneracji u myszy BALB/c. Zoperowano mięśnie *Gastrocnemius*, *Soleus* i *EDL*, zaszyto skórę, a zwierzęta pozostawiono na 14 dni. W 14 dniu po operacjach myszy uśmiercono i wyizolowano mięśnie, które poddano procedurom zamrażania i barwienia opisanym w Materiałach i metodach. Wykazano, że mięśnie myszy 14 dni po zmiążdżeniu są już w znacznym stopniu zregenerowane (ryc. 2 A mięśnie nie operowane, ryc. 2B mięśnie po 14 dniach regeneracji).



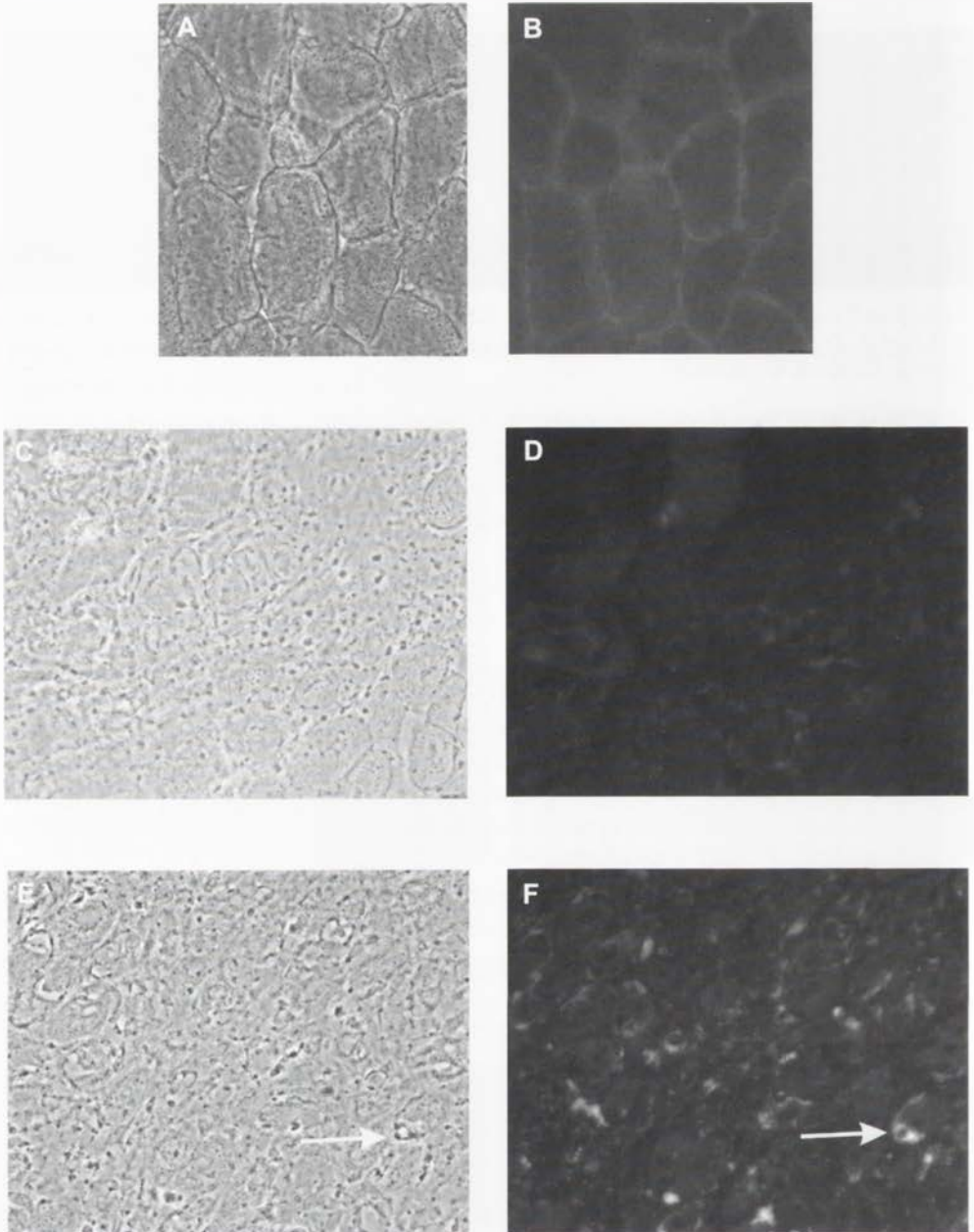
RYCINA 1. Przebieg hodowli komórek satelitowych myszy (A – komórki w fazie proliferacji, B – komórki fuzujące, C – miotuby)



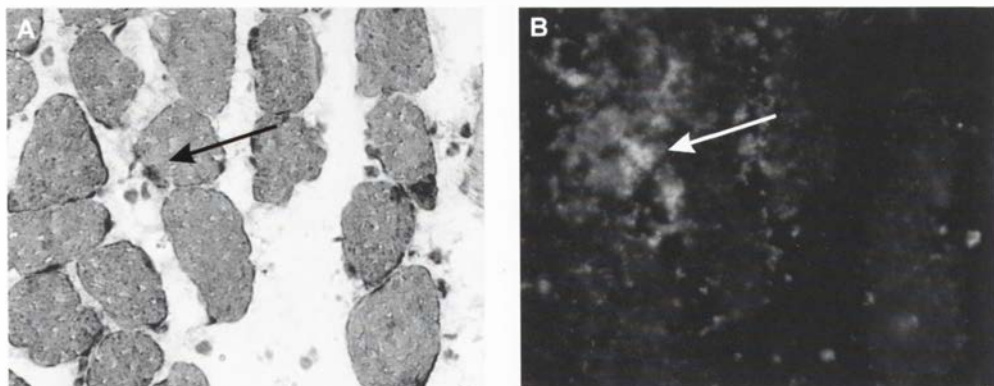
RYCINA 2. Skrawki mięśni myszy BALB/c (*m. gastrocnemius*) A – kontrola, B – 14 dzień regeneracji



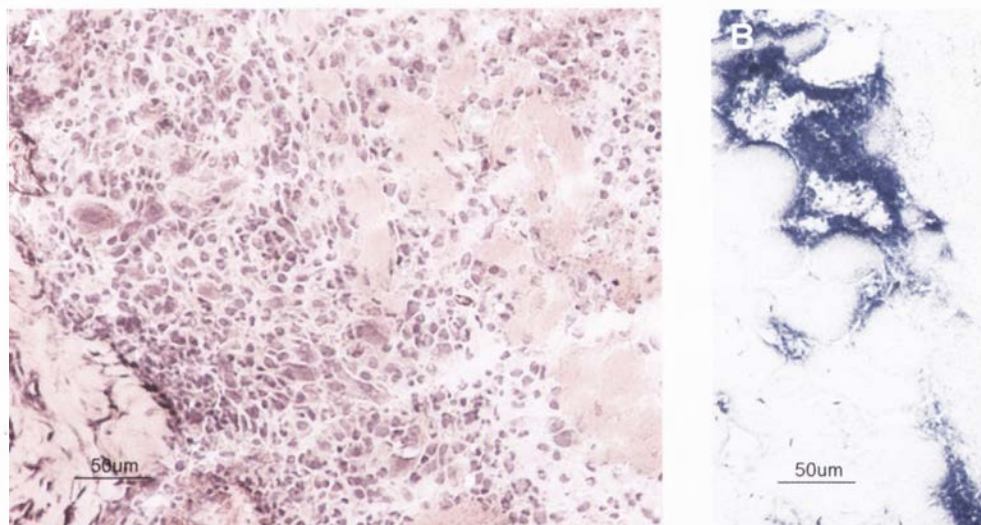
RYCINA 3. Skrawki z *m. gastrocnemius* myszy SCID: A – mięsień nieoperowany, B i C – po 7 dniach regeneracji; strzałki – jądra nowoutworzonych włókien mięśniowych



RYCINA 4. A,B – skrawki z *m. gastrocnemius* – mięsień nieoperowany, bez komórek macierzystych; C, D – skrawki z *m. gastrocnemius* – 7 dzień regeneracji bez komórek macierzystych; E, F – skrawki z *m. gastrocnemius* – 7 dzień regeneracji, mysz nastrzyknięta dootrzewnowo komórkami macierzystymi znakowanymi PKH67-GL; mikroskop fluorescencyjny, pow. obj. 40x (A, C, E – kontrasta fazowy, B, D, F – fluorescencja)



RYCINA 5. Skrawki z *m. gastrocnemius* (SCID), 24 godziny po podaniu domięśniowo ludzkiej krwi pępowinowej, A – barwienie hematoksyliną, B – znakowanie antyludzkim CXCR4, pow. obj. 40x



RYCINA 6. Skrawki z *m. gastrocnemius* myszy SCID, którym po operacji wstrzyknięto domięśniowo ludzkie komórki macierzyste: A – barwienie hematoksyliną/eozyną; B – znakowanie antyludzkim CXCR4

Następnie operacjom poddano myszy SCID, aby porównać morfologię i regenerację mięśni u myszy z niedomogą immunologiczną. Mięśnie nieoperowane nie wykazują żadnych odchyżeń w budowie morfologicznej w porównaniu z myszami BALB/c. W siódmym dniu regeneracji w zmiądzzonych i odnerwionych wcześniej mięśniach częściowo odtworzona jest już architektura mięśnia (włókna mięśniowe o niewielkiej średnicy z jądrami komórkowymi w centrum). Wykazano, że mięśnie szkieletowe myszy o upośledzonym układzie immunologicznym regenerują podobnie do mięśni myszy BALB/c (ryc. 3).

3. Transplantacja ludzkich komórek macierzystych myszom SCID

W pierwszym etapie komórki znakowano znacznikiem błonowym PKH67-GL. Komórki podawano myszom SCID dootrzewnowo siedem dni przed zmiżdżeniem mięśni. Po kolejnych siedmiu dniach (regeneracja mięśni) myszy uśmiercono i mięśnie zamrażano i pocięto na skrawki. Wykonano również preparaty w następujących wariantach (kontrola wyników):

- skrawki mięśni myszy bez ludzkich komórek macierzystych, mięśnie nieoperowane
- skrawki mięśni myszy bez komórek macierzystych, mięśnie operowane.

Wykazano obecność ludzkich komórek macierzystych w mięśniach myszy operowanych, którym podano dootrzewnowo ludzkie komórki macierzyste na tydzień przed operacjami (ryc. 4 F). Może to świadczyć o udziale tych komórek w procesie regeneracji mięśni myszy SCID. W mięśniach myszy, które nie były operowane, nie zaobserwowano znakowania (ryc. 4 B,D). Ze względu na to, że mięśnie szkieletowe wykazują w niewielkim stopniu fluorescencję (ryc. 4 B), a napływające w trakcie regeneracji komórki własne myszy mogą powodować dodatkowe niespecyficzne świecenie, wykonano następną serię doświadczeń dla potwierdzenia uzyskanych wcześniej wyników z immunocytochemicznym wykrywaniem ludzkich komórek macierzystych.

Przygotowane wcześniej myszy SCID nastrzyknięto domięśniowo ludzkimi komórkami macierzystymi. Po upływie 24 godzin myszy uśmiercono, wykonano skrawki mrożeniowe i preparaty, aby wykazać obecność ludzkich komórek macierzystych w mięśniach. Przy pomocy barwienia hematoksyliną i eozyną uwidoczniło włókna mięśniowe i jądra komórek znajdujących się pomiędzy nimi (ryc.5 A).

Wykonano również preparaty, na których przy pomocy znakowania przeciwciałem skierowanym przeciwko ludzkiemu receptorowi CXCR4 wyznakowano ludzkie komórki macierzyste (ryc. 5B, strzałki wskazują te same punkty na preparatach widzianych w świetle przechodzącym – A i fluorescencję – B). Wykazano obecność ludzkich komórek macierzystych w mięśniach myszy SCID 24 godziny po nastrzyknięciu do mięśni nieuszkodzonych miażdżeniem.

W następnym etapie badano wpływ ludzkich komórek macierzystych, podawanych domięśniowo tuż po zmiżdżeniu mięśnia, na regenerację mięśni myszy z niedomogą immunologiczną. Zoperowano myszy i w zależności od wariantu podawano 500 tys. lub 1 mln ludzkich komórek macierzystych do zmiżdżonych mięśni. Po zaszcyciu skóry pozostawiono zwierzęta na 7 dni. Następnie myszy uśmiercono, wyizolowano mięśnie i poddawano procedurom opisanym w materiałach i metodach. Wykonano preparaty barwione (hematoksylina/eozyna) i znakowanie immunocytochemiczne. Barwienie skrawków uwidoczniło włókna mięśniowe i jądra komórek znajdujących się pomiędzy nimi (ryc. 6 A).

Znakowanie skrawków przeciwciałem skierowanym przeciwko ludzkiemu CXCR4 nie wykazało jednoznacznie obecności ludzkich komórek macierzystych w operowanych mięśniach myszy SCID po siedmiu dniach od podania komórek macierzystych (ryc. 6 B).

WNIOSEK

W obecnym etapie trudno wnioskować o udziale wszczepionych komórek macierzystych człowieka w regeneracji mięśni szkieletowych myszy. Konieczne są dalsze doświadczenia.

LITERATURA

- [1] CHAMBERS RL, MCDERMOTT JC, Molecular basis of skeletal muscle regeneration, *Can J Appl Physiol* 1992; **21**(3):155–184.
- [2] COSSU G. Somitic and non somitic progenitors of skeletal muscle. W: *Stem cells and cell signaling in skeletal myogenesis*. ELSEVIER 2002.
- [3] FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G, MAVILIO F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; **279**:1528–1530.
- [4] Le MOIGNE, MARTELLY I, BARLOVATZ-MEIMON G, FRANQUINET R, AAMIRI A, FRISDAL E, BASSAGLIA Y, MORACZEWSKI J, GAUTRON J, Characterization of myogenesis from adult satellite cells *in vitro*. *Int J Dev Biol* 1990; **34**: 171–180.
- [5] LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**(5):1188–1199, .
- [6] PILLARISSETTI K, GUPTA SK, Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 2001; **25**(5): 293–300 .
- [7] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2003, w druku.
- [8] UCKUN FM. Severe combinet immunodeficient mouse models of human leukemia. *Blood* 1996; **88**(4):1135–1146.
- [9] ZIMOWSKA M, SZCZEPANKOWSKA D, STREMINSKA W, PAPY D, TOURNAIRE MC, GAUTRON J, BARRITAUULT D, MORACZEWSKI, MARTELLY I. Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration. *J Cell Phys* 2001; **188**: 178–187.

Adres autora: Zakład Cytologii UW
ul. Miecznikowa 1, Warszawa

OCENA DOJRZEWANIA KOMÓREK PROGENITOROWYCH MEGAKARIOCYTÓW W HODOWLI *IN VITRO* KOMÓREK MACIERZYSTYCH HEMATOPOEZY

CHARACTERISTIC OF MATURATION OF MEGAKARYOCYTE
PROGENITOR CELLS IN *IN VITRO* CULTURE OF HEMATOPOIETIC
STEM CELLS

Urszula BANY-ŁASZEWICZ, Edyta KLIMCZAK-JAJOR,
Grażyna PAŁYNYCZKO*, Jerzy KOŚCIELAK, Joanna KAMIŃSKA

Zakład Biochemii, *Klinika Chorób Wewnętrznych
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie: Możliwość izolacji komórek macierzystych i ich hodowli *in vitro*, w kierunku określonych komórek progenitorowych hematopojezy przeszczepianych następnie pacjentom, stwarza szansę nowej generacji terapii komórkowej w leczeniu wielu defektów układu krwiotwórczego, w tym m.in. małopłytkowości. Do chwili obecnej nie opracowano procedury hodowli *in vitro*, która zapewniałaby uzyskanie wystarczającej dla celów klinicznych liczby prekursorów megakariopojezy. Celem pracy jest opracowanie warunków ekspansji *ex vivo* komórek progenitorowych megakariocytów. Otrzymane wyniki umożliwiły wstępną optymalizację warunków hodowli. Charakterystyka fenotypowa i morfologiczna potwierdziły różnicowanie komórek inicjujących hodowlę w kierunku komórek progenitorowych megakariocytów. Korelacja aktywności α 1,6-fukozylotransferazy (6FucT) z ilością komórek o fenotypie CD41a⁺ w hodowli wskazuje, że aktywność tego enzymu może stanowić nowy, kolejny wskaźnik różnicowania i dojrzewania komórek CD34⁺ w kierunku megakariocytów.

Słowa kluczowe: komórki progenitorowe megakariocytów, ekspansja *ex vivo*, α 1,6-fukozylotransferaza.

Summary: The possibility of isolation of stem cells and *in vitro* expansion of hematopoietic progenitors creates the possibility of a new generation cellular therapy in treating hematopoietic defects including thrombocytopenia. No *in vitro* culture has been developed yet, which might yield a sufficient number of

*Praca finansowana ze środków KBN w ramach zadania badawczego Nr PBZ-501/Z/13/11/2002 (grant zamawiany Nr K045/P05/2002).

megakaryopoietic precursors for clinical purposes. Hence, the aim of the study is to elaborate a technique of *ex vivo* expansion of megakaryocyte progenitor cells. The results made the initial optimisation of culture conditions possible. The analysis of phenotype and morphology confirmed the differentiation and maturation of cultured cells into megakaryocyte progenitors. The correlation of activity of $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase (6FucT) with the number of CD41a+ cells indicates that the activity of this enzyme might be an additional, new sign of differentiation of CD34⁺ cells into megakaryocytes.

Key words: megakaryocyte progenitor cells, *ex vivo* expansion, $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase.

WPROWADZENIE

Ekspansja *ex vivo* komórek hematopoetycznych – aspekty kliniczne

Przeszczepianie hematopoetycznych komórek macierzystych jest uznaną metodą leczenia szeregu nowotworów zarówno litych, jak i chorób rozrostowych. Zawarte w materiale przeszczepowym; szpiku kostnym, mobilizowanej krwi obwodowej i krwi pępowinowej, komórki macierzyste odpowiedzialne są za pełną rekonstrukcję mielo- i limfopojezy [9,18]. Wiadomo, że regeneracja i szybkość odnowy hematopojezy po przeszczepie związana jest z ilością przetoczonych komórek, w tym komórek CD34⁺ zawierających populację komórek macierzystych. W niektórych przypadkach pozyskanie materiału do przeszczepu zawierającego odpowiednią ilość komórek macierzystych może być trudne np. u chorych po wielokrotnych kursach chemioterapii, u których planowana jest autotransplantacja czy u dorosłych biorców krwi pępowinowej. Dlatego na świecie prowadzone są próby ekspansji *ex vivo* komórek macierzystych wykorzystywanych następnie przy transplantacji. Dotychczas podjęto wiele prób hodowli i przeszczepiania komórek krwiotwórczych. Jak dotąd sukcesem zakończyły się tylko te przeszczepy, w których podawano łącznie „standardowy” materiał przeszczepowy oraz poddane ekspansji *ex vivo* komórki macierzyste [1,7,9,17]. Natomiast po przeszczepieniu tylko komórek CD34⁺ poddanych ekspansji *ex vivo*, bez jednoczesnego podania „standardowego” materiału przeszczepowego, nie obserwowano trwałej odnowy neutrofilów oraz rekonstrukcji krwinek płytkowych [11]. Dlatego też możliwość izolacji komórek macierzystych i ich hodowli *in vitro* w kierunku określonych komórek progenitorowych hematopojezy przeszczepianych następnie pacjentom, stwarza szansę nowej generacji terapii komórkowej w leczeniu wielu defektów układu krwiotwórczego w tym m.in. małopłytkowości [9,19,21].

Ekspansja *ex vivo* komórek progenitorowych megakariopoezy

Małopłytkowość stanowi istotny problem kliniczny u pacjentów onkologicznych i hematologicznych, którzy poddawani są wysokim dawkom chemioterapii [10]. Gwałtowny spadek liczby płytek krwi jest przyczyną krwawień stanowiących bezpośrednie zagrożenie życia pacjenta. Obecnie leczenie małopłytkowości polega na

allogenicznych transfuzjach preparatów płytkowych. Metoda ta niesie ze sobą niebezpieczeństwo powikłań, dlatego też poszukuje się alternatywnej metody leczenia małopłytkowości. Podawanie czynników wzrostu stymulujących megakariopoezę stanowi jedną z dróg tych poszukiwań. W ostatnich latach opisano szereg cytokin i czynników wzrostu stymulujących megakariopoezę, takich jak: trombopoetyna (TPO), czynnik komórek macierzystych (SCF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), Flt3-ligand oraz interleukiny: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 [3,15,16]. Jednak efekt kliniczny podjętych badań był nieznaczny i jednocześnie obserwowano toksyczność terapii. Poszukuje się więc innych metod leczenia małopłytkowości. Jedną z nich jest przeszczep komórek progenitorowych megakariocytów namnożonych *in vitro*. Dotychczasowe i obecne badania koncentrują się na doborze optymalnego składu cytokin w hodowli, tak aby uzyskać maksymalną ilość komórek, które po przeszczepieniu będą zdolne do produkcji płytek krwi w organizmie biorecy [5,20]. Wykazano, że hodowla *in vitro* komórek macierzystych krwi z różnymi kombinacjami cytokin, takich jak: TPO, IL-3, IL-6, IL-11, SCF, GM-CSF i Flt3-ligand, stwarza korzystne warunki do wzrostu komórek progenitorowych megakariocytów [4,6,8,23]. Pierwszą próbę kliniczną transplantacji autologicznych komórek progenitorowych megakariocytów, namnożonych *ex vivo* w obecności koktajlu cytokin (MIP-1 α , Flt3-ligand, IL-3, IL-6, IL-11, SCF, TPO) wykonał Bertolini [4]. Pomimo że u żadnego z pacjentów nie uniknięto małopłytkowości po przeszczepieniu komórek CD61⁺, to jednak u chorych, którym podano najwięcej komórek (21 x 10⁵ CD61⁺/kg ciała) uniknięto transfuzji płytek krwi. Te niezwykle zachęcające wyniki skłaniają do poszukiwania optymalnej strategii hodowli *in vitro* komórek progenitorowych megakariocytów w celu dalszych zastosowań klinicznych. W związku z tym konieczne staje się dokładniejsze poznanie procesów różnicowania i dojrzewania megakariocytów.

Aktywność α 1,6-fukozylotransferazy a ploiddia megakariocytów

Jednym z enzymów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania megakariocytów i płytek krwi jest α 1,6-fukozylotransferaza (6FucT). Płytki uwalniają enzym 6FucT do surowicy w procesie krzepnięcia krwi lub pod wpływem działania agonistów [2,14]. Biologiczne znaczenie uwalniania 6FucT z płytek jest nieznane, ale wiadomo, że enzym ten jest niezbędny do syntezy komponenty cukrowej glikoproteiny GpIIb-IIIa [22], niezbędnej do wiązania fibrynogenu. 6FucT występuje w płytce nie tylko w formie błonowej w aparacie Golgiego, ale również, prawdopodobnie w formie rozpuszczalnej, w α -granulach [12]. Kościelak i wsp. [13] zasugerowali, że aktywność 6FucT w płytkach i dojrzewających megakariocytach może być markerem poziomu ploiddii komórek, ponieważ aktywność enzymu znacząco wzrasta w płytkach w przypadku małopłytkowości. Powyższa hipoteza zakłada, że płytki o wysokiej aktywności 6FucT są uwalniane z megakariocytów o wysokiej ploiddii. A zatem aktywność 6FucT w płytkach może mieć wartość diagnostyczną w rozpoznawaniu przyczyn małopłytkowości u chorych. Również pojawienie się aktywności tego enzymu w hodowli *in vitro* komórek CD 34⁺ może wskazywać na różnicowanie tych komórek w kierunku megakariocytów.

CEL PRACY

Celem podjętych badań jest opracowanie warunków hodowli *in vitro* komórek progenitorowych megakariocytów powstających z wielopotencjalnych komórek macierzystych.

MATERIAŁY I METODY

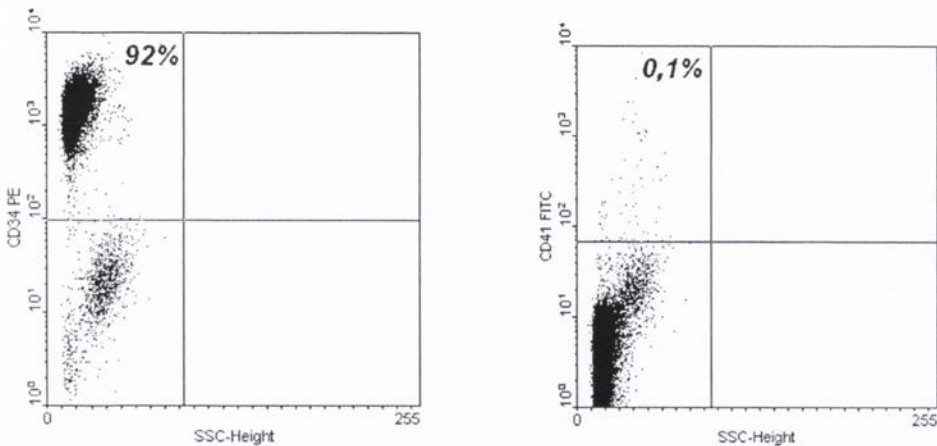
Komórki o fenotypie CD34⁺ izolowano z krwi pępowinowej. Krew pobierano przez nakłucie żyły sznura pępowinowego, po urodzeniu i odpięciu dziecka, do przystosowanych do tego celu pojemników zawierających antykoagulant (CPD). Z krwi rozcieńczonej 1:2 PBS (BioMed Lublin) izolowano w gradiencie gęstości (1,077 g/ml) komórki jednojądrzaste, które następnie pozbawiano komórek adherentnych poprzez 24 godziną inkubację uzyskanej zawiesiny komórek w podłożu IMDM (Gibco) z 5% surowicą cielęcą (FBS). Z komórek nieadherentnych izolowano następnie komórki o fenotypie CD34⁺, metodą immunomagnetycznego sortowania komórek z użyciem zestawu firmy Miltenyi Biotec. Ocenę czystości rozdziału wykonywano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałem antyCD34-PE, z zastosowaniem odpowiedniej kontroli izotypowej. Komórki CD34⁺ hodowano w gęstości nie większej niż 1×10^6 komórek/ml, w podłożu IMDM zawierającym 1% albuminę cielęcą (BSA), 25% sztuczną surowicę (liposomy, insulina, transferyna), antybiotyki, glutaminę (2 mM) oraz różne kombinacje cytokin tj. IL-1 (20 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), SCF (20 ng/ml), Flt3 (40 ng/ml) oraz TPO (50 ng/ml). Hodowle prowadzono w 24-dołkowych płytkach w inkubatorze CO₂ w 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności. W kolejnych dniach hodowli oceniano gęstość, żywotność i fenotyp komórek. Oceny fenotypowej komórek dokonywano metodą FACS (w cytometrze FACSCalibur, BD Biosciences) z użyciem przeciwciał anty: CD34-PE, CD14-PE, CD33-FITC, CD61-FITC, CD41a-FITC z zastosowaniem odpowiednich kontroli izotypowych (BD Pharmingen).

Aktywność enzymu 6FucT oznaczano w komórkach, po uprzedniej ich solubilizacji, metodą izotopową. Preparat enzymu z substratami GDP[¹⁴C]fukozą i asialoagalaktotransferyną glikopeptydem poddawano inkubacji. Produkt reakcji izolowano metodą chromatografii bibułowej i następnie analizowano przy użyciu licznika scyntylacyjnego.

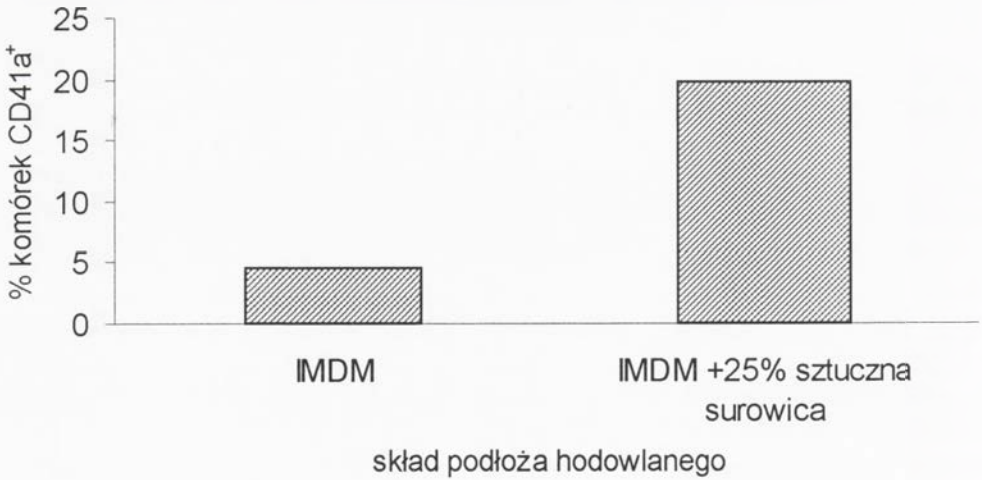
Oceny morfologii komórek w hodowli *in vitro* dokonywano metodą barwienia May-Grünwalda Giemsy. Z komórek pobranych w kolejnych dniach hodowli wykonywano rozmaz na szkiełku mikroskopowym, przy użyciu cytowirówki. Preparat barwiono barwnikiem May-Grünwalda, a następnie barwnikiem Giemsy i oglądano w mikroskopie świetlnym (Nikon).

WYNIKI

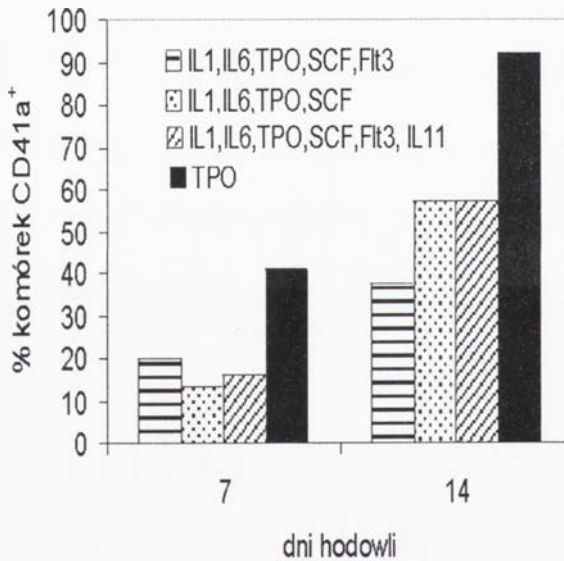
W wyniku immunomagnetycznej selekcji komórek CD34⁺ otrzymano frakcję pozytywną, w której komórki CD34⁺ stanowiły średnio $92,6 \pm 2,7\%$. Przykładową analizę fenotypową komórek frakcji pozytywnej przedstawiono na rycinie 1. W celu optymalizacji warunków hodowli komórek CD34⁺ i ich różnicowania w kierunku megakariocytów stosowano różne układy doświadczalne. Po pierwsze, zbadano wpływ podłoża IMDM wzbogaconego w 25% sztuczną surowicę na procentową zawartość komórek o fenotypie CD41a⁺ w hodowli *in vitro*. W tym celu prowadzono równolegle hodowle w podłożu IMDM oraz w podłożu IMDM wzbogaconym. W obydwu wariantach komórki były hodowane w obecności BSA, glutaminy, mieszaniny cytokin (IL-1, IL-3, IL-6, TPO, Flt3, SCF) oraz antybiotyków, jak opisano w rozdziale Materiały i Metody. Otrzymane wyniki wykazały, że komórki hodowane w podłożu IMDM z 25% sztuczną surowicą różnicują się lepiej w kierunku megakariocytów niż komórki hodowane w samym podłożu IMDM (ryc.2). W dalszych eksperymentach stosowano więc podłoże IMDM wzbogacone w 25% sztuczną surowicę. W kolejnym etapie badań zbadano wpływ IL-3 na różnicowanie komórek CD34⁺. W tym celu hodowlę zakładano w obecności IL-3, a następnie w dniu 3 połowę komórek z hodowli zawieszano w podłożu bez IL-3. W 7 i 14 dniu hodowli oceniano gęstość, żywotność oraz fenotyp komórek. Otrzymane wyniki wykazały, że w dniu 7 ekspansja komórek o fenotypie CD41a⁺ w obydwu wariantach była podobna, natomiast w dniu 14 hodowli w podłożu bez IL-3 obserwowano 3,4 razy większy procent komórek CD41a⁺ niż w podłożu z IL-3. Jednocześnie w obecności IL-3 komórki proliferowały szybciej i miały lepszą żywotność. W związku z tym w dalszych eksperymentach wydłużono czas hodowli



RYCINA 1. Analiza fenotypowa komórek inicjujących hodowlę *in vitro*: z nieadherentnych komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej wyizolowano komórki o fenotypie CD34⁺ metodą immunomagnetycznego sortowania komórek (MACS). Ocenę fenotypową komórek z frakcji pozytywnej wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałami antyCD34-PE i antyCD41a-FITC, z zastosowaniem odpowiednich kontroli izotypowych. Wyniki przedstawiono w procentach komórek w hodowli



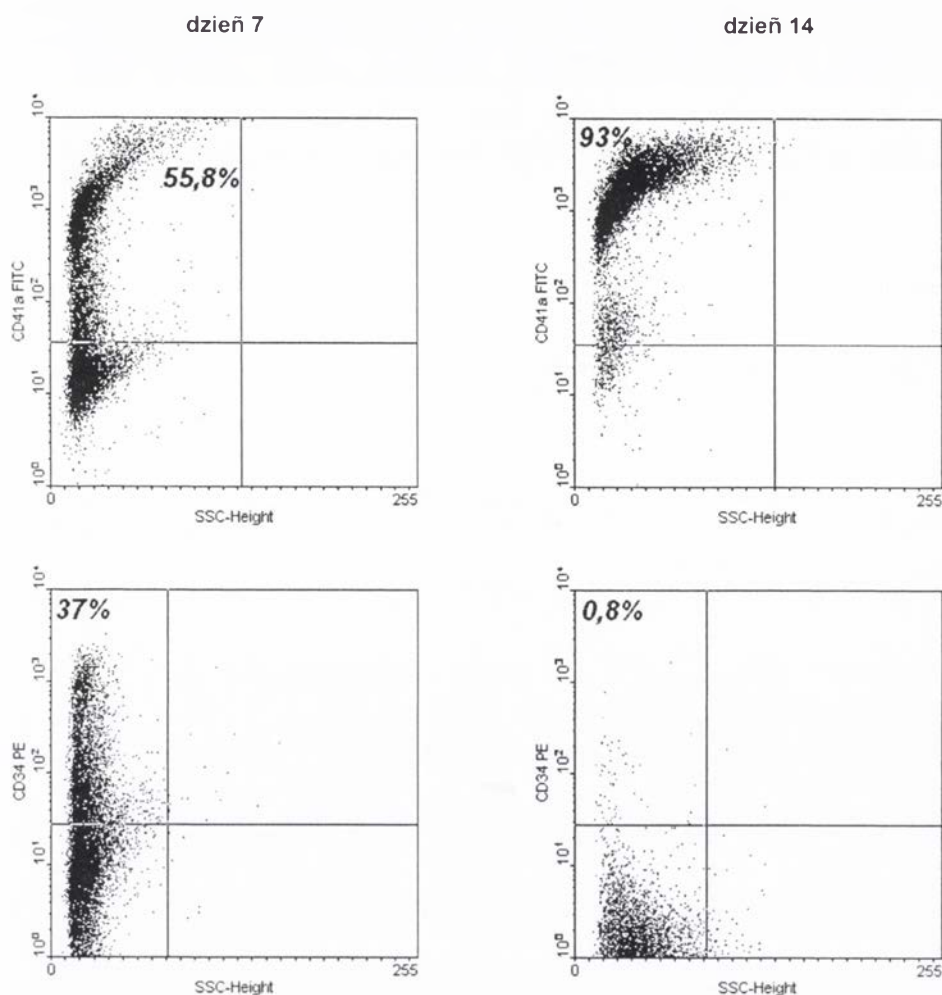
RYCINA 2. Wpływ składu podłoża hodowlanego na ekspansję komórek progenitorowych megakariocytów: *IMDM* – komórki hodowane w podłożu *IMDM* zawierającym 1% BSA, antybiotyki, glutaminę (2 mM) oraz cytokiny: IL-1 (20 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), SCF (20 ng/ml), Flt3 (40 ng/ml) oraz TPO (50 ng/ml). *IMDM + 25% sztuczna surowica* – komórki hodowane w podłożu o składzie jak wyżej, wzbogaconym w 25% sztuczna surowice. Ocenę fenotypową komórek w hodowli wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałami antyCD41a-FITC, z zastosowaniem odpowiedniej kontroli izotypowej



RYCINA 3. Wpływ kompozycji cytokin na ekspansję komórek progenitorowych megakariocytów: Komórki CD34⁺ hodowano w podłożu *IMDM* zawierającym 25% sztuczna surowicę, 1% BSA, antybiotyki, glutaminę (2 mM) oraz różne kombinacje cytokin, tj. IL-1 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), SCF (20 ng/ml), Flt3 (40 ng/ml) oraz TPO (50 ng/ml). W każdym wariancie komórki hodowano do dnia 7 z IL-3 (10 ng/ml). Ocenę fenotypową komórek w hodowli wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałami antyCD41a-FITC, z zastosowaniem odpowiedniej kontroli izotypowej

komórek w obecności IL-3 do dnia 7, a następnie kontynuowano hodowlę w podłożu bez IL-3.

W celu dalszej optymalizacji warunków hodowli zbadano wpływ pozostałych cytokin na ekspansję komórek progenitorowych megakariocytów. Największy odsetek komórek o fenotypie CD41a⁺ uzyskano w podłożu z samą TPO (ryc. 3). Ten wariant stosowano w dalszych eksperymentach, w których oceniono w hodowli między innymi procent komórek o fenotypie CD41a⁺ i CD34⁺. Wykazano, że wraz ze wzrostem

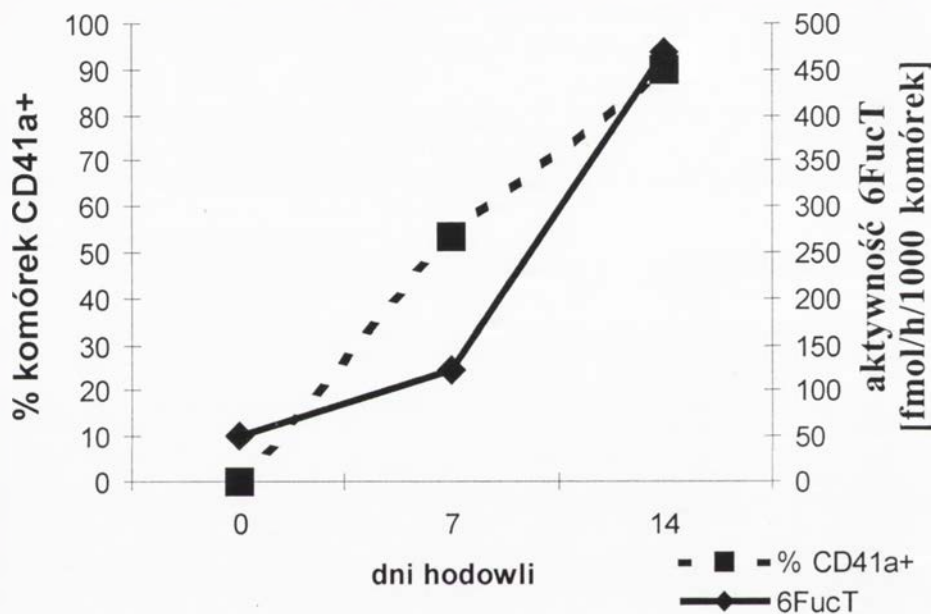


RYCINA 4. Analiza fenotypowa komórek progenitorowych megakariocytów w hodowli *in vitro*: Komórki CD34⁺ hodowano w podłożu IMDM zawierającym 1% BSA, 25% sztuczną surowicę, antybiotyki, glutaminę (2 mM), IL-3 do dnia 7 (10 ng/ml) i TPO (50 ng/ml). Ocenę fenotypową komórek wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałami antiCD34-PE i antiCD41a-FITC, z zastosowaniem odpowiednich kontroli izotypowych. Wyniki przedstawiono w procentach komórek w hodowli

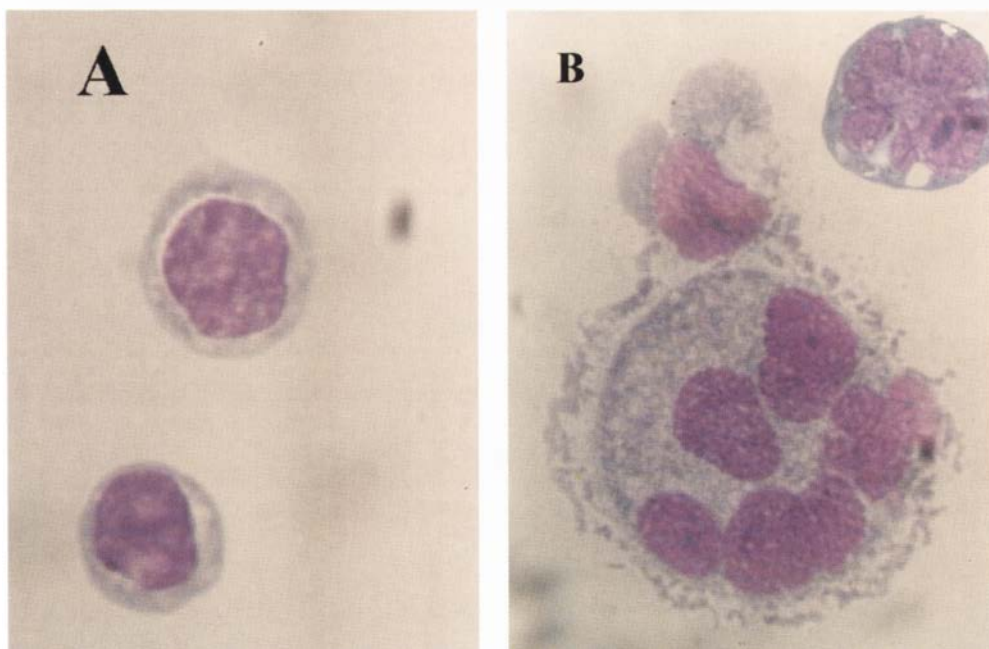
odsetka komórek CD41a⁺ spada odsetek komórek CD34⁺ (ryc.4). W celu określenia optymalnego czasu trwania hodowli oceniono żywotność oraz fenotyp komórek w dniach od 7 do 14. Począwszy od 11 dnia hodowli żywotność komórek wykazywała tendencję spadkową i wynosiła poniżej 90%. Jednocześnie w tym dniu obserwowano procent komórek CD41a⁺ zbliżony do wartości uzyskanej w 14 dniu hodowli.

W solubilizatach komórek pobranych z hodowli w kolejnych dniach obserwowano wzrastającą aktywność 6FucT. Wyniki te korelują z obserwowanym wzrastającym odsetkiem komórek o fenotypie megakariocytów (ryc.5).

Morfologia komórek w trakcie hodowli była zróżnicowana. Komórki CD34⁺ inicjujące hodowlę miały morfologię typową dla wczesnych komórek hematopoetycznych (ryc.6A). W 7 dniu dominowały komórki z pojedynczym jądrem i zasadochłonną cytoplazmą. Obserwowano też obecność komórek z wielopłatowym jądrem wypełniającym prawie całkowicie objętość komórki i z zasadochłonną cytoplazmą, a także komórek, w których platy stanowiły jakby odrębne jądra a cytoplazma była mniej zasadowa (ryc. 6B).



RYCINA 5. Aktywność 6FucT w komórkach progenitorowych megakariocytów w hodowli *in vitro*: Komórki CD34⁺ hodowano w podłożu IMDM zawierającym 25% sztuczną surowicę, 1% BSA, antybiotyki, glutaminę (2 mM), IL-3 do 7 dnia (10 ng/ml), TPO (50 ng/ml). Aktywność enzymu 6FucT w komórkach oznaczano metodą izotopową. Ocenę fenotypową komórek w hodowli wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FACS) po uprzednim znakowaniu komórek przeciwciałami antyCD41a-FITC, z zastosowaniem odpowiedniej kontroli izotopowej.



RYCINA 6. Ocena morfologiczna komórek progenitorowych megakariocytów w hodowli *in vitro*: komórki CD34⁺ hodowano w podłożu IMDM zawierającym 25% sztuczną surowicę, 1% BSA, antybiotyki, glutaminę (2 mM), IL-3 do dnia 7 (10 ng/ml), TPO (50 ng/ml); oceny morfologii komórek w hodowli *in vitro* dokonywano metodą barwienia May-Grünwalda Giemsa. A – komórki CD34⁺ w 1 dniu hodowli *in vitro*, B – komórki progenitorowe megakariocytów w 7 dniu hodowli *in vitro* (pow. 1000x)

PODSUMOWANIE

Prowadzone badania umożliwiły wstępną optymalizację warunków hodowli *in vitro* komórek progenitorowych megakariocytów wyprowadzanych z komórek macierzystych hematopoezy. Wdrożono metodę immunomagnetycznej izolacji komórek CD34⁺, uzyskując średnio 92,6% komórek o fenotypie CD34⁺. Stwierdzono korzystny wpływ wzbogacenia podłoża IMDM w sztuczną surowicę na ekspansję komórek progenitorowych megakariocytów. Dokonano wyboru optymalnego składu cytokin w podłożu hodowlanym. Największy odsetek komórek o fenotypie megakariocytów (90,2% komórek CD41a⁺) uzyskano w podłożu z TPO i IL-3 (obecną do 7 dnia hodowli). Wraz ze wzrostem odsetka komórek CD41a⁺ obserwowano spadek odsetka komórek CD34⁺. Świadczy to o różnicowaniu komórek inicjujących hodowlę w kierunku komórek progenitorowych megakariocytów. Również ocena morfologiczna komórek potwierdziła ich różnicowanie i dojrzewanie. Megakariocyty są unikalnymi komórkami hematopoetycznymi ze względu na poliploidalność jądra komórki, które powstaje w wyniku procesu endomitozy. W trakcie hodowli obserwowano obecność komórek z dużym, wielopłatowym jądrem, co świadczyło o zachodzących podziałach endomitotycznych.

W trakcie dojrzewania komórek w hodowli zaobserwowano wzrost aktywności $\alpha 1,6$ -fukozylotransferazy (6FucT) w komórkach przy jednoczesnym spadku odsetka komórek CD34⁺ i wzroście odsetka komórek CD41a⁺. Korelacja aktywności 6FucT z ilością komórek o fenotypie CD41a⁺ w hodowli *in vitro* wskazuje, że aktywność tego enzymu może stanowić nowy, kolejny wskaźnik różnicowania i dojrzewania komórek CD34⁺ w kierunku megakariocytów.

LITERATURA

- [1] ALCORN MJ, HOLYOAKE TL, RICHMOND L, PEARSON C, FARRELL E, KYLE B. CD34⁺ cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded *ex vivo* and used for transplantation with little or no toxicity. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 1839–1847.
- [2] ANTONIEWICZ J, BYKOWSKA K, ZDEBSKA E, KOŚCIELAK J. Human platelets release α -6-fukosyltransferase upon activation. *FEBS Lett* 1989; **244**: 388–390.
- [3] BEGLEY CG, BASSER RL. Biologic and structural differences of thrombopoietic growth factors. *Semin Hematol* 2000; **37**: 19–27. (suppl 4)
- [4] BERTOLINI F, BATTAGLIA M, PEDRAZZOLI P, DA PRADA GA, LANZA A, SOLIGO D, CANEVA L, SARINA B, MURPHY S, THOMAS T, ROBUSTELLI DELLA CUNA G. Megakaryocytic progenitors can be generated *ex vivo* safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 1997; **89**: 2679–2688.
- [5] BLAIR A, BAKER CL, PAMPHILON DH, JUDSON PA. *Ex vivo* expansion of megakaryocyte progenitor cells from normal bone marrow and peripheral blood and from patients with haematological malignancies. *B J Hematol* 2002; **116**: 912–919.
- [6] BROUDY VC, LIN NL, KAUSCHANSKY K. Trombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood* 1995; **85**: 1719–1726.
- [7] BRUGGER W, HEIMFELD S, BERENSON RJ, MERTELSMANN R, KANZ L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *in vivo*. *N Engl J Med* 1995; **333**: 283–287.
- [8] DOLZHANSKIY A, HIRST J, BASCH RR, KARPATKIN S. Complementary and antagonistic effects of IL-3 in the early development of human megakaryocytes in culture. *B J Hematol* 1998; **100**: 415–426.
- [9] EMERSON SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 1996; **87**: 3082–3088.
- [10] HASSAN HT, ZANDER A. Thrombocytopenia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: An unresolved problem and possible approaches to resolve it. *J Hematother* 1996; **5**: 407–414.
- [11] HOLYOAKE TL, ALCORN MJ, RICHMOND L, FARRELL E, PEARSON C, GREEN R, DUNLOP DJ, FITZSIMONS E, PRAGNELL IB, FRANKLIN IM. CD34 positive PBSC expanded *ex vivo* may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 1905–1101.
- [12] KAMIŃSKA J, MUSIELAK M, NOWICKA A, WOŹNIEWICZ B, KOŚCIELAK J. Neutrophils promote the release of α -6-fukosyltransferase from blood platelets through the action of cathepsin G and elastase. *Biochimie* 2001; **83**: 739–742.
- [13] KOŚCIELAK J, ANTONIEWICZ-PAPIS J, ZDEBSKA E, MAJ S, LESZKO B. Activity of platelet alpha-6-fukosyltransferase is inversely related to blood platelet concentration. *Acta Biochim Pol* 1995; **42**: 35–39.
- [14] KOŚCIELAK J, PACUSZKA T, KUBIN J, ZDZIECHOWSKA H. Serum α -6-fukozylnotransferazy is released from platelets during clotting of blood. *Glycoconjugate J* 1987; **4**: 43–49.
- [15] KUTER DJ. Future directions with platelet growth factors. *Semin Hematol* 2000; **37**: 41–49 (suppl 4).
- [16] MASLAK P, NIMER S. The efficacy of IL-3, SCF, IL-6 in treating thrombocytopenia. *Semin Hematol* 1998; **35**: 253–260.

- [17] MCNIECE I. Transplantation of *ex vivo* expanded PBSC after high-dose chemotherapy results in decreased neutropenia. *Blood* 1998; **923**, (suppl 1, abstr 1256).
- [18] MCNIECE I, BRIDDEL R. *Ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol* 2001; **29**: 3–11.
- [19] PECORA AL. Progress in clinical application of use of progenitor cells expanded with hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 2001; **8**: 142–148.
- [20] RATAJCZAK JMACHALIŃSKI B, SAMUEL A PERTUSINI E, MAJKA M, CZAJKA R, RATAJCZAK MZ. A novel serum-free system for cloning human megakaryocytic progenitors (CFU-M): the role of thrombopoietin and other cytokines on bone marrow and cord blood CFU-M growth under serum free conditions. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 55–60.
- [21] SCHEDING S, KRATZ-ALBERS K, MEISTER B, BRUGGER W, KANZ L. *Ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use. *Semin Hematol* 1998; **35**: 232–240.
- [22] TSUJI T, OSAWA T: Structures of the carbohydrate chains of membrane glycoprotein Iib and Iia of human platelets. *J Biochem* 1986; **100**: 1387–1398.
- [23] WILLIAMS JL, PIPIA GG, DATTA NS, LONG MW. Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal *ex vivo* expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood* 1998; **91**: 4118–4126.

;
Adres autora: Zakład Biochemii, Instytut Hematologii
i Transfuzjologii, Chocimska 5, 00-957 Warszawa.
email: ubany@ihit.waw.pl

KOMÓRKI MACIERZYSTE JAKO NARZĘDZIE TERAPEUTYCZNE W SCHORZENIACH NEUROLOGICZNYCH*

STEM CELLS IN THERAPY OF NEUROLOGIC DISORDERS

Bożena KAMIŃSKA

Pracownia Regulacji Transkrypcji,
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

Streszczenie: Choroby neurodegeneracyjne są heterogenną grupą schorzeń o zróżnicowanym obrazie klinicznym i odmiennym podłożu, których cechą wspólną jest dysfunkcja lub zanik szczególnie wrażliwych populacji komórek nerwowych. Występowanie selektywnego zaniku komórek nerwowych pozwala na zastosowanie jednolitej strategii terapeutycznej polegającej na zastępowaniu ubytków nowymi komórkami, zdolnymi podjąć funkcje utraconych komórek. Od 20 lat trwają próby przywrócenia prawidłowych funkcji za pomocą transplantacji komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych, zwłaszcza w chorobie Parkinsona i Huntingtona. Próby kliniczne koncentrowały się dotychczas na transplantacji fragmentów embrionalnej tkanki nerwowej, zawierających częściowo zróżnicowane neuroblasty dopaminergiczne, które w mózgu gospodarza mają zdolność różnicowania w dojrzałe neurony. Niedawne odkrycie, że niedojrzałe, wielopotencjalne, progenitorowe komórki neuronalne mogą być izolowane z centralnego układu nerwowego zarówno rozwijającego się zarodka, jak i organizmu dojrzałego oraz utrzymywane i namnażane w hodowli, stwarza dodatkowe możliwości potencjalnych zastosowań w zastępowaniu ubytków neuronalnych i terapii genowej. Obecność w szpiku kostnym i krwi pępowinowej komórek macierzystych/prekursorowych, które mają zdolność do samopowieliania się i różnicowania *in vitro* w komórki nerwowe, otwiera możliwość wykorzystania nieembrionalnych komórek macierzystych z tych źródeł w terapii chorób neurodegeneracyjnych i urazów mózgu. Przedmiotem tego opracowania jest krytyczna analiza dostępnych w literaturze przykładów pozyskiwania i wykorzystania komórek macierzystych/prekursorowych w terapii schorzeń neurologicznych oraz rozważania na temat kluczowych problemów, które muszą być rozwiązane, aby komórki macierzyste stały się użytecznym narzędziem terapeutycznym.

Słowa kluczowe: neurodegeneracja, ischemia, komórki macierzyste, progenitory neuronalne, endogenne komórki macierzyste.

Summary: Although neurodegenerative diseases have different and highly specific causes, the dysfunction or loss of a vulnerable group of neurons is common to all these disorders. It may allow the development of similar therapeutic strategies based on „neural cell replacement concept”. Cell transplantation has over the last two decades emerged as a promising approach for restoration of function in neurodegenerative diseases, in particular Parkinson’s and Huntington’s disease. Clinical trials have so far focused on the use of implants of embryonic tissue containing already fate-committed dopaminergic neuroblasts with the capacity to develop into fully mature neurons in their new location in the host brain. The recent demonstration that immature neural progenitor cells with multipotent properties can be isolated from both the developing and adult CNS and that these cells can be maintained and propagated in culture, has provided a new interesting tool for restorative cell replacement and gene transfer therapies. The existence of stem/progenitor cells in postnatal bone marrow and umbilical cord blood and their possibility to proliferate and differentiate into nervous system cells, opens up the possibility of using stem cells found in these tissues to treat degenerative and post-traumatic diseases of the central nervous system. The purpose of this review is to discuss the prospects of the emerging progenitor cell technology for cell replacement and restorative therapies in neurodegenerative diseases, and consider some of the critical issues that must be solved in order to make stem cells useful in brain repair.

Key words: neurodegeneration, ischemia, stem cells neuronal progenitors, endogenous stem cells.

1. ŚMIERĆ KOMÓREK NERWOWYCH JAKO PIERWOTNY MECHANIZM CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Choroby neurodegeneracyjne są heterogenną grupą schorzeń o zróżnicowanym obrazie klinicznym i odmiennym podłożu, których cechą wspólną są zmiany morfologii i zanik niektórych populacji komórek nerwowych. Selektywny zanik populacji komórek nerwowych: neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona, neuronów cholinergicznych w chorobie Alzheimera, motoneuronów w stwardnieniu zanikowym bocznym oraz oligodendrocytów w stwardnieniu rozsianym jest wspólną cechą przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych.

Chociaż nie we wszystkich schorzeniach neurodegeneracyjnych śmierć komórek ma charakter wyłącznie apoptotyczny, większość badaczy zgadza się, że proces ten ma znaczenie dominujące w chorobach Alzheimera, Parkinsona, stwardnieniu rozsianym bocznym, demencjach skojarzonych z AIDS, w starzeniu mózgu oraz w udarze. Udar mózgu jest jedną z najczęstszych przyczyn śmiertelności w krajach wysoko rozwiniętych. W USA i Europie na udar mózgu zapada rocznie 1,5 mln osób. W Polsce rozpoznaje się w tym czasie udar mózgu u 60 tys. osób, z których 1/3 umiera w ciągu roku. W pierwszych czterech tygodniach po udarze mózgu umiera co czwarty chory. Jedna trzecia pacjentów, którzy przeżywają pierwszy miesiąc choroby, pozostaje niesprawna w zakresie podstawowych czynności życiowych. Ryzyko zachorowania na udar mózgu wzrasta z wiekiem. Ze 100 tys. sześćdziesięcio- i siedemdziesięciolatek około 400 rocznie doznaje udaru mózgu. Niedotlenienie-hipoksja mózgu u wcześniaków i noworodków prowadzące do uszkodzenia istoty białej kory mózgowej (*periventricular leukomalacia* – PVL), są często przyczyną uszkodzenia mózgu, które powoduje porażenie mózgowe i chroniczne zmiany neurologiczne [5].

2. KOMÓRKI MACIERZYSTE JAKO NARZĘDZIE TERAPEUTYCZNE W SCHORZENIACH NEUROLOGICZNYCH

Koncepcja wykorzystania komórek macierzystych jako narzędzia terapeutycznego w schorzeniach neurologicznych (*neural cell replacement therapy*) bazuje na przekonaniu, że funkcje neurologiczne utracone w wyniku uszkodzenia mózgu lub przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych mogą być całkowicie lub częściowo odtworzone przez wprowadzenie nowych komórek, które mogą zastąpić funkcjonalnie utracone komórki nerwowe. Zastosowania terapeutyczne wymagają stosunkowo łatwo dostępnego źródła niezróżnicowanych komórek macierzystych, które mogą być użyte do transplantacji [38]. Możliwość izolacji znacznej liczby komórek toti- lub pluripotencjalnych, ich namnażanie *in vitro* w celu otrzymania większej liczby komórek i specyficzne różnicowanie w kierunku określonego typu komórek nerwowych pod wpływem określonej kombinacji czynników neurotroficznych i hormonów, może ułatwić ich zastosowanie w klinice.

2.1. Zarodkowe komórki macierzyste w terapii schorzeń neurologicznych

Pierwsze próby terapeutycznego zastosowania komórek macierzystych dotyczyły schorzeń neurologicznych, w których dobrze scharakteryzowane było podłoże choroby i znane były zwierzęce modele doświadczalne. Transplantacja zarodkowych neuronów dopaminergicznych do prądkowia gryzoni i małp naczelnych w zwierzęcym modelu choroby Parkinsona powodowała częściowe przywrócenie funkcji [31]. W chorobie Parkinsona (PD) dochodzi do degeneracji neuronów dopaminergicznych istoty czarnej, które pełnią ważną rolę w neuroprzekaznictwie. Ich brak upośledza aktywację kory prefrontalnej zaangażowanej w regulację funkcji motorycznych. Komórki płodowe użyte do transplantacji pochodziły z fragmentu mózgu (z 6–8-tygodniowych płodów), w którym normalnie różnicują neurony dopaminergiczne istoty czarnej. Zostały przeszczepione do prądkowia pacjentów z zaawansowaną PD, struktury docelowej dla neuronów dopaminergicznych [43, 44, 52]. Przeszczepione neurony dopaminergiczne przeżywały, unerwiały prądkowie i tworzyły połączenia neuronalne [43, 44]. Transplantacja zarodkowych komórek macierzystych do prądkowia przywracała syntezę dopaminy oraz normalizowała poziom jej wydzielania [60]. Obserwowano przywrócenie aktywacji kory związane z funkcjami motorycznymi oraz znaczącą poprawę funkcji ruchowych. Poprawę objawów klinicznych obserwowano w 6–24 miesiące po transplantacji i efekt utrzymywał się przez 5–10 lat. U pacjentów operowanych jednostronnie efekt pozytywny był również jednostronny i dotyczył kończyn po stronie przeciwnej do prądkowia, do którego przeszczepiono komórki. Aczkolwiek wyniki doświadczeń ze względu na małą liczbę osobników (oraz występujący w PD efekt placebo) budzą ciągle zastrzeżenia, według informacji z bazy danych w ciągu 13 lat przeszczepiono ludzkie komórki zarodkowe 300 pacjentom z PD i u wielu z nich obserwowano pozytywny efekt terapeutyczny, zwłaszcza u pacjentów poniżej 60 roku życia [19, 21].

Choroba Huntingtona (HD) jest chorobą dziedziczną, w której w wyniku progresywnych wielokrotnych powtórzeń trinukleotydu (CAG)_n w genie kodującym białko Huntingtine, powstaje nieprawidłowe białko. Prowadzi to do śmierci komórek nerwowych i postępującej neurodegeneracji, zwłaszcza w prążkowie i korze mózgowej. Doświadczalna iniekcja neurotoksyn do prążkowiecia lub systemowa iniekcja toksyn mitochondrialnych imituje neuropatologiczne, neurochemiczne i behawioralne cechy choroby u gryzoni i małp. Transplantacja komórek macierzystych z rozwijającego się przodomózgowia powodowała tworzenie się w miejscu iniekcji struktur przypominających prążkowie. Niektóre z przeszczepionych komórek różnicowały w neurony prążkowiecia i tworzyły GABAergiczne połączenia synaptyczne z właściwą strukturą – *globus pallidus* (gałka biała); otrzymywały też połączenia z innych struktur mózgu, takich jak kora i podwzgórze [40, 58]. Częściowe odtworzenie sieci połączeń neuronalnych było wystarczające do częściowego odtworzenia prawidłowych funkcji w modelu choroby Huntingtona u małp i gryzoni [8, 9]. Podjęto próby kliniczne nad transplantacją komórek macierzystych z płodowego prążkowiecia do prążkowiecia kilku pacjentów z HD [6, 59]. W 3 przypadkach (3 z 5) obserwowano poprawę funkcji motorycznych i poznawczych. Autopsja jednego z pacjentów, który zmarł w 18 miesięcy po zabiegu, ujawniła, że przeszczepione komórki przeżyły i tworzyły połączenia z tkanką gospodarza.

Udar mózgu jest następstwem nagłego zaburzenia dopływu krwi do pewnego obszaru mózgu. Może być spowodowany przez: niedokrwienie, gdy jedno z naczyń doprowadzających krew do mózgu zostaje nagle zamknięte i przepływ krwi jest niewystarczający (poniżej wartości krytycznej) lub krwawienie z nagle pękniętego naczynia krwionośnego. Mniej więcej 85–90% udarów mózgu stanowi zawał mózgu, czyli udar niedokrwienny. W wyniku tego procesu komórki nerwowe w strefie ogniska niedokrwiennego otrzymują za mało tlenu oraz substancji odżywczych i ulegają zniszczeniu. Wokół ogniska niedokrwiennego powstaje znacznie większy obszar umiarkowanego niedokrwienia, zaopatrywany przez krążenie oboczne, określane półcieniem (*ischemic penumbra*), w którym czynność neuronów zanika, ale nie dochodzi do natychmiastowych zmian morfologicznych [2, 32]. W obszarze tym dochodzi do opóźnionej śmierci neuronalnej, której konsekwencją jest zanik komórek nerwowych, zaburzenie czynności ruchowych i poznawczych. Globalne niedokrwienne uszkodzenie mózgu może też być wywołane zatrzymaniem akcji serca lub zablokowaniem naczyń wieńcowych, co prowadzi do nagłego i niemal całkowitego zatrzymania przepływu krwi w mózgu. Prowadzi to do śmierci niektórych szczególnie wrażliwych na niedokrwienie populacji, np. neuronów pola CA1 hipokampa. Zwierzęce modele niedokrwienia ogniskowego i globalnego imitują odpowiednio udar mózgu i zatrzymanie akcji serca/zablokowanie naczyń wieńcowych.

Wyniki badań nad transplantacją płodowych komórek nerwowych do mózgu zwierząt po ischemii (MCAo – *middle cerebral artery occlusion model*) nie dały jednoznacznych wyników. Transplantacja fragmentów płodowej (E17) kory mózgowej do uszkodzonego mózgu w 21 dni po wywołaniu ischemii ogniskowej nie wywoływała poprawy deficytów neurologicznych w standardowych warunkach [29].

Przeszczepienie fragmentów płodowego prążkownia do uszkodzonej części mózgu zwierząt w 14 dni po MCAo przyniosło poprawę funkcji motorycznych i behawioralnych [53]. Poprawę funkcji motorycznych i behawioralnych (badano pamięć przestrzenną i zdolność uczenia się) obserwowano u szczurów, którym wstrzyknięto do uszkodzonego hipokampa mysie komórki unieśmiertelnionej linii wyprowadzonej z neuroepitelium. Niektóre z przeszczepionych komórek charakteryzowały się ekspresją markerów typowych dla neuronów lub astrocytów [69]. Wydaje się, że pozytywny efekt przeszczepianych komórek przypisać należy raczej czynnikom troficznym wydzielanym przez te komórki niż odtwarzaniu prawidłowych połączeń neuronalnych.

Użycie nerwowych komórek macierzystych lub niedojrzałych progenitorów do transplantacji może wymagać uprzedniego ich różnicowania do bardziej określonego typu komórek. Wyniki doświadczeń z przeszczepianiem komórek pokazują, że zdolność mózgu biorcy do kierowania różnicowaniem wielopotencjalnych, niedojrzałych komórek w sposób tkankowo-specyficzny zmniejsza się w trakcie rozwoju lub zanika. Wyjątkiem są dwie struktury mózgu: zakręt zębaty hipokampa i strefa subkomorowa (SVZ – *subventricular zone*), gdzie także w dorosłym organizmie powstają nowe, nerwowe komórki macierzyste.

Wykorzystanie ludzkich komórek embrionalnych bądź płodowych do celów terapeutycznych jest skomplikowane i wzbudza szereg dylematów etycznych, z powodu których ich wykorzystanie jest bardzo ograniczone. Wymaga to poszukiwania innych źródeł wielopotencjalnych komórek macierzystych, które byłyby zdolne różnicować w komórki nerwowe.

2.2. Nieembrionalne komórki macierzyste w terapii schorzeń neurologicznych

Komórki podścieliska (MSC – *marrow stromal cells*) wywodzą się ze szpiku kostnego i są komórkami niekrwiotwórczymi, które mogą różnicować w wiele typów komórek mezenchymalnych. Stwierdzono, że po dożylnym podaniu komórek podścieliska część z nich różnicuje w komórki mające cechy fenotypowe komórek nerwowych [13, 52]. Komórki takie były wykrywane w opuszkach węchowych (*olfactory bulbs*) dorosłych myszy, miejscu intensywnej regeneracji. Wykazano, że komórki podścieliska wszczepione do mózgu szczura lub myszy przeżywały kilka miesięcy bez wywoływania odpowiedzi układu odpornościowego i migrowały podobnie jak astrocyty [61]. U myszy iniekcja dożylna MSC powodowała, że część komórek przedostawała się do mózgu, gdzie różnicowała w mikroglej i astrocyty [22]. Doświadczenia z transplantacją genetycznie zmodyfikowanych komórek, które miały dwa geny niezbędne do produkcji dopaminy (brak tego neuroprzekaźnika odpowiada za część objawów choroby Parkinsona) wskazują na możliwość użycia komórek macierzystych jako nośników substancji mających działanie troficzne.

W warunkach *in vitro* uzyskano różnicowanie komórek podścieliska szpiku kostnego [65, 77, 78] i komórek z krwi pępowinowej w kierunku komórek wykazujących cechy fenotypowe komórek nerwowych [7, 14, 27, 30, 66]. Różnicowanie komórek uzyskiwanych w hodowli komórek podścieliska szpiku kostnego bądź krwi pępowinowej oceniano głównie poprzez ekspresję markerów typowych dla komórek nerwowych:

NeuN, neurofilament, β -Tubulina klasy III, MAP2 (*microtubule associated protein-2*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), Gal-C. Brak jest danych funkcjonalnych weryfikujących, że zróżnicowane fenotypowo komórki mają właściwości funkcjonalne charakterystyczne dla danego typu komórek nerwowych. Niepokojący też jest, obserwowany przez niektórych autorów, fakt ekspresji kilku markerów neuronalnych i glejowych w tej samej komórce, co wskazuje na nieprawidłowość procesów różnicowania.

Wyniki tych kompleksowych badań nad iniekcją komórek podścieliska (BM) zwierzętom w 1 dzień po wywołaniu ischemii ogniskowej, wskazują na znaczącą poprawę deficytów neurologicznych, chociaż nie obserwowano zmniejszenia się obszaru uszkodzenia [45]. Po iniekcji dożylniej komórki podścieliska przechodzą barierę krew-mózg i gromadzą się preferencyjnie w rejonie uszkodzenia. Wykazano, że w 14 dni po iniekcji po stronie uszkodzonej było 4% wstrzykniętych komórek, głównie wokół naczyń krwionośnych, tylko nieliczne komórki znajdowano w parenchymie mózgu. Wykorzystując podwójne barwienia wykazano, że niewielki procent komórek (1%) wykazywał ekspresję markerów neuronalnych; 5% komórek charakteryzowało się ekspresją GFAP – markera astrocytów. Obserwowano zmniejszenie się liczby komórek umierających w wyniku apoptozy i zwiększenie liczby komórek proliferujących w neurogenicznej strefie podkomorowej (SVZ – *subventricular zone*). Niewielka liczba wstrzykniętych komórek wykrywana w mózgu wskazuje, że ich pozytywny wpływ wynika raczej z wpływu na procesy reperacji/regeneracji niż z zastępowania utraconych neuronów. Wyniki Li i współautorów [45] wskazują, że obecność komórek podścieliska zwiększa poziom czynników troficznych, takich jak BDNF (czynnik neurotroficzny pochodzący z mózgu) czy czynnik wzrostu nerwu NGF w rejonie uszkodzenia. Obecność tych czynników może zwiększać migrację nerwowych komórek progenitorowych, które mogą zasiedlać uszkodzoną strukturę i wspomagać procesy regeneracji.

Krew pępowinowa zawiera mezenchymalne komórki progenitorowe oraz liczne prekursorzy komórek endotelialnych. Wykazano, że szczury ischemiczne, którym w 24 godziny po wywołaniu ischemii ogniskowej dożylnie wstrzyknięto (do żyły ogonowej) komórki ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB – *human umbilical cord blood*), wykazywały znaczącą poprawę funkcji motorycznych i obniżenie niepożądanych objawów neurologicznych [17]. Nie wykazano zmniejszenia obszaru uszkodzenia mózgu (*infarct volume*). W doświadczeniach użyto 3 x 10⁶ HUCBC/na zwierzę. Komórki HUCB zawierały 77,2–95% komórek CD34+. Wykorzystując przeciwciała rozpoznające jądrowe białko ludzkie, autorzy wykryli około 1% komórek HUCB w mózgu, zwłaszcza po stronie ischemicznej, wokół ogniska niedokrwienia. W niewielkiej części komórek HUCB w mózgu wykrywano ekspresję markerów neuronalnych (2% NeuN⁺, 3% MAP-2⁺), astrocytarnych (6% GFAP⁺) i endothelialnych (8%). Pewną część komórek HUCB wykrywano w szpiku (3%), śledzionie (1%) oraz mięśniach, sercu, płucach i wątrobie (0,01–0,5%). Zwykle komórki występowały wokół naczyń krwionośnych, tylko nieliczne lokalizowano w parenchymie. Wyniki wskazywały, że komórki HUCB migrują do mózgu, preferencyjnie do miejsca uszkodzenia. Może to być związane z uszkodzeniem bariery krew-mózg po stronie uszkodzonej lub co bardziej prawdopodobne, lokalny stan zapalny w ognisku ischemicznym i produkcja cytokin oraz

chemokiny wywołują ukierunkowaną migrację komórek. Nie stwierdzono, czy komórki tworzyły połączenia neuronalne w tkance nerwowej. Ponieważ liczba komórek była niewielka, nie dochodziło do zastępowania ubytków neuronalnych i postuluje się raczej neurotroficzne działanie komórek HUCB bądź stymulowanie przez nie endogennych, nerwowych komórek macierzystych. Co ciekawe dożylnie podanie komórek HUCB miało podobny wpływ jak podanie komórek bezpośrednio do uszkodzonej struktury [76]. Pozytywny efekt dożylniej iniekcji komórek HUCB obserwowano także w modelu traumatycznego uszkodzenia mózgu szczurów [45, 47] (Lu i wsp., 2002).

Niedawno wykazano, że mobilizowane podaniem cytokiny G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) komórki prekursorowe krwi obwodowej mogą być dobrym źródłem autologicznych komórek macierzystych. Mobilizowane podaniem G-CSF komórki prekursorowe krwi obwodowej wstrzyknięte szczurom w 24 godz. po wywołaniu ischemii ogniskowej, powodowały poprawę zaburzeń neurologicznych. Hamowały zwłaszcza pojawianie się jednostronnego zaburzenia funkcji motorycznych [75].

Przedstawione powyżej dane, sugerujące pozytywny efekt terapeutyczny komórek z krwi pępowinowej w ischemicznym uszkodzeniu mózgu, są zachęcające. Pochodzą jednak z jednego laboratorium i w innych ośrodkach nie udało się ich na razie powtórzyć. Wyniki naszych własnych badań z podawaniem komórek z krwi pępowinowej do żyły ogonowej szczurów w różnym czasie po ischemii wskazują, że ułamek procenta podawanych komórek trafia do mózgu. Jednakże dalsze badania są niezbędne, aby potwierdzić, czy ich obecność przekłada się na efekt terapeutyczny.

Wyniki z kilku laboratoriów wskazują na obecność wielopotencjalnych komórek macierzystych oraz licznych komórek prekursorowych w krwi pępowinowej i możliwość uzyskania hodowli komórek zróżnicowanych, mających pewne cechy komórek nerwowych [7, 14, 27, 30, 66]. Zatem ludzka krew pępowinowa może stanowić stosunkowo łatwo dostępne źródło niezróżnicowanych komórek macierzystych, które mogą być użyte do autologicznych transplantacji. Liczba komórek macierzystych w krwi pępowinowej jest jednak niewielka, a dotychczas brak jednolitego protokołu, który pozwalałby w powtarzalny sposób uzyskiwać znaczną liczbę z takiego źródła. Otrzymywanie z krwi pępowinowej znacznej liczby komórek pluripotencjalnych, ich namnażanie *in vitro* w celu zwiększenia liczby komórek i specyficzne różnicowanie w kierunku określonego typu komórek nerwowych pod wpływem określonej kombinacji czynników neurotroficznych i hormonów, co jest warunkiem ich zastosowania w klinice, wymaga dalszych badań.

2.3. Nerwowe komórki macierzyste w terapii schorzeń neurologicznych

Nerwowe komórki macierzyste (NCS – *neural stem cells*) mogą być izolowane z tkanki płodowej lub osobników dorosłych, są zdolne do podziałów i różnicowania w neurony, astrocyty i oligodendrocyty *in vitro* [24, 50, 51]. NSC transplantowane do mózgu (zwłaszcza do obszarów neurogenicznych, takich jak SVZ lub hipokamp) różnicują w zależności od środowiska i części mózgu, w jakiej się znajdują [23, 68, 70]. Pomimo znacznej plastyczności tych komórek, są jednak pewne ograniczenia, gdyż po transplantacji do nieneurogenicznych obszarów mózgu (mózdżek, prądkowie) NSC

różnicują głównie w komórki glejowe, zwłaszcza w astrocyty [18, 68, 72]. Zjawisko to nasila się w sytuacji uszkodzenia układu nerwowego [16]. Obecność NSC w dojrzałym mózgu stwarza możliwość ich wykorzystania do repopulacji uszkodzonych części mózgu [16]. Jednakże ograniczona dostępność tych komórek, różnicowanie do typu niezgodnego z oczekiwaniami, jak np. różnicowanie NSC do komórek kwiatowców *in vivo* [12], zmuszają do poszukiwania łatwiej dostępnego źródła komórek wielopotencjalnych.

3. ENDOGENNE KOMÓRKI MACIERZYSTE W MÓZGU W SYTUACJACH PATOLOGICZNYCH

W sytuacjach patologicznych dochodzi do aktywacji NSC, które proliferują i migrują do miejsca uszkodzenia. W większości badanych modeli uszkodzenia układu nerwowego prowadzących do proliferacji endogennych NSC, powstające komórki są w większości komórkami glejowymi [27, 41]. Obecność prekursorów glejowych (*glial-restricted precursors*) w układzie nerwowym jest bardziej powszechna, gdyż stanowią one znaczny procent NSC, np. u szczurów po podaniu bromodezoksyurydyny 70–75% komórek pozytywnych ma też marker prekursorowego gleju, NG2. Wyniki ostatnich badań wskazują, że prekursor gleju, zwłaszcza tzw. glej radialny, mogą być także prekursorem neuronów [48, 56]. Wydaje się, że jedną z funkcji prekursorowego gleju jest tworzenie nowych oligodendrocytów (OL). Wiadomo, że liczba progenitorowych, niedojrzałych OL wzrasta po uszkodzeniu mechanicznym i w stanach demielinizacji. Wykorzystując znakowanie endogennych komórek prekursorowego gleju wektorem retrowirusowym z GFP (*green fluorescent protein*), wykazano, że wyznakowane komórki różnicują w dojrzałe OL i odtwarzają mielinową otoczkę aksonów [26]. Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania endogennych NSC lub prekursorów gleju w remielinizacji [16].

Do aktywacji endogennych, nerwowych komórek macierzystych dochodzi po uszkodzeniu wywołanym niedokrwieniem i wydaje się, że endogenne komórki przyczyniają się do regeneracji hipokampalnych neuronów piramidowych [54]. NSC proliferują i migrują do hipokampa, gdzie tworzą nowe neurony. Zwykle regeneracyjny potencjał endogennych NSC jest ograniczony, może on być jednak zwiększony po podaniu czynników wzrostowych, takich jak FGF2 i EGF [54]. Wyniki te wskazują na nowy kierunek działań, który polegałby na stymulowaniu endogennych nerwowych komórek macierzystych i wykorzystaniu ich zdolności do regeneracji.

PODSUMOWANIE

Szereg pozytywnych doświadczeń wskazuje, że funkcje neurologiczne utracone w wyniku uszkodzenia mózgu lub przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych, mogą

być częściowo odtworzone przez wprowadzenie komórek macierzystych, które mogą zastąpić funkcjonalnie utracone komórki nerwowe bądź ułatwić regenerację. Zastosowania terapeutyczne wymagają stosunkowo łatwo dostępnego źródła nieodróżnicowanych komórek macierzystych, które mogą być użyte do transplantacji. Aczkolwiek spore nadzieje budzą wyniki badań nad wykorzystaniem komórek macierzystych izolowanych z podścieliska szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej lub krwi pępowinowej, dane te są zbyt wstępne i niepowtarzalne, aby przejść już do zastosowań klinicznych. Najbardziej przekonujące wyniki uzyskano w doświadczeniach nad transplantacją embrionalnych lub płodowych, nerwowych komórek macierzystych, które ze względu na pluripotencjalny charakter mogły w mózgu dawcy przeżywać i przynajmniej częściowo odtwarzać utracone funkcje. Jak na razie nie ma dowodów, aby przeszczepione komórki odtwarzały prawidłowe połączenia neuronalne. Wydaje się, że podstawą ich terapeutycznego efektu jest wprowadzenie do uszkodzonej tkanki nerwowej czynników prożyciowych i neurotroficznych, które mogą wspomagać rozwój endogennych komórek macierzystych oraz zjawiska regeneracji. Duże nadzieje budzi zjawisko migracji komórek macierzystych do miejsca uszkodzenia, gdyż można będzie wykorzystać je jako nośniki czynników protekcyjnych lub deficytowych (transplantacja komórek produkujących dopaminę w chorobie Parkinsona) w określonych schorzeniach neurologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADER M, SCHACHNER M, BARTSCH U. Transplantation of neural precursor cells into the dysmyelinated CNS of mutant mice deficient in the myelin-associated glycoprotein and Fyn tyrosine kinase. *Eur J Neurosci* 2001; **14**: 561–566.
- [2] ASTRUP J, SIESJO BK, SYMON L. Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; **12**: 723–725.
- [3] BACHOUD-LEVI AC, REMY P, NGUYEN JP, BRUGIERES P, LEFAUCHEUR JP, BOURDET C i wsp. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 2000; **356**: 1975–1979.
- [4] BACK SA, HAN BH, LUO NL, CHRICTON CA, XANTHOUDAKIS S, TAM J, ARVIN KL, HOLT-ZMAN DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002a; **22**: 455–463.
- [5] BACK SA, LUO NL, BORENSTEIN NS, VOLPE JJ, KINNEY HC. Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002b; **61**: 197–211.
- [6] BACHOUD-LEVI AC, REMY P, NGUYEN JP, BRUGIERES P, LEFAUCHEUR JP i wsp. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 2000; **356**: 1975–1979.
- [7] BICKNESE AR, GOODWIN HS, QUINN CO, HENDERSON VC, CHIEN SN, WALL DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplantation* 2002; **11**: 261–264.
- [8] BJORKLUND A, LINDVALL O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000a; **3**: 537–544.
- [9] BJORKLUND A, LINDVALL O. Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med* 2000b; **6**: 1207–1208.

- [10] JORKLUND LM, SANCHEZ-PERNAUTE R, CHUNG S, ANDERSSON T, CHEN IY, MCNAUGHT KS, BROWNELL AL, JENKINS BG, WAHLESTEDT C, KIM KS, ISACSON O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2344–2349.
- [11] BJORKLUND A, DUNNETT SB, BRUNDIN P, STOESSL AJ, FREED CR, BREEZE RE, LEVIVIER M, PESCHANSKI M, STUDER L, BARKER R. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2003; **2**: 437–445.
- [12] BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; **283**: 534–537.
- [13] BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**: 1775–1779.
- [14] BUZANSKA L, MACHAJ EK, ZABLOCKA B, POJDA Z, DOMANSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Science* 2002; **115**: 2131–2138.
- [15] CAIRNS K, FINKLESTEIN SP. Growth factors and stem cells as treatments for stroke recovery. *Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America* 2003; **14**: 135–142.
- [16] CAO Q, BENTON RL, WHITTEMORE SR. Stem cell repair of central nervous system injury. *J Neurosci Res* 2002; **68**: 501–510.
- [17] CHEN J, LI Y, WANG L, LU M, ZHANG X, CHOPP M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; **189**: 49–57.
- [18] CHOW SY, MOUL J, TOBIAS CA, HIMES BT, LIU Y, OBROCKA M, HODGE L, TESSLER A, FISHER I. Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat cord. *Brain Res* 2000; **874**: 87–106.
- [19] CLARKSON ED. Fetal tissue transplantation for patients with Parkinson's disease: a database of published clinical results. *Drugs Aging* 2001; **18**: 773–785.
- [20] DEMENEIX B, BEHR J, BOUSSIF O, ZANTA MA, ABDALLAH B, REMY J. Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **30**: 85–95.
- [21] DUNNETT SB, BJÖRKLUND A, LINDVALL O. Cell therapy in Parkinson's disease – stop or go? *Nature Rev Neurosci* 2001; **2**: 365–369.
- [22] EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4080–4085.
- [23] GAGE FH, COATES PW, PALMER TD, KUHN HG, FISHER LJ, SUHONEN JO, PETERSON DA, SUHR ST, RAY J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11879–11883.
- [24] GAGE FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; **287**: 1433–1438.
- [25] GARBUZOVA-DAVIS S, WILLING AE, ZIGOVA T, SAPORTA S, JUSTEN EB, LANE JC, HUDSON JE, CHEN N, DAVIS CD, SANBERG PR. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 255–270.
- [26] GENSERT JM, GOLDMAN JE. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 1997; **19**: 197–203.
- [27] GOODWIN HS, BICKNESE AR, CHIEN SN, BOGUCKI BD, QUINN CO, WALL DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood & Marrow Transplantation* 2001; **7**: 581–588.
- [28] GOTTLIEB DI. Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 2002; **25**: 381–407.
- [29] GRABOWSKI M, JOHANSSON BB, BRUNDIN P. Neocortical grafts placed in the infarcted brain of adult rats: few or no efferent fibers grow from transplant to host. *Exp Neurol* 1995; **134**: 273–276.
- [30] HA Y, CHOI JU, YOON DH, YEON DS, LEE JJ, KIM HO, CHO YE. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *Neuroreport* 2001; **12**: 3523–3527.
- [31] HERMAN JP, ABRIOUS ND. Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol* 1994; **44**: 1–35.
- [32] HOSSMANN KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; **36**: 557–565.
- [33] HURLBERT MS, GIANANI RI, HUTT C, FREED CR, KADDIS FG. Neural transplantation of hNT neurons for Huntington's disease. *Cell Transplant* 1999; **8**: 143–151.
- [34] ISACSON O. The production and use of cells as therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurology* 2003; **2**: 417–424.

- [35] JEONG SW, CHU K, JUNG KH, KIM SU, KIM M, ROH JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003; **34**: 2258–2263.
- [36] JOHANSSON CB, MOMMA S, CLARKE DL, RISLING M, LENDAHL U, FRISEN J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; **96**: 25–34.
- [37] JOHANSSON CB, SVENSSON M, WALLSTEDT L, JANSON AM, FRISEN J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 1999; **253**: 733–736.
- [38] KARASIEWICZ J, MODLIŃSKI JA Komórki macierzyste ssaków: potencjalne źródło zróżnicowanych komórek do transplantacji. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 219–242.
- [39] KEEGAN DJ, KENNA P, HUMPHRIES MM, HUMPHRIES P, FLITCROFT DI, COFFEY PJ, LUND RD, LAWRENCE JM. Transplantation of syngeneic Schwann cells to the retina of the rhodopsin knockout (rho^{-/-}) mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 3526–3532.
- [40] KENDALL AL, RAYMENT FD, TORRES EM, BAKER HF, RIDLEY RM, DUNNETT SB. Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med* 1998; **4**: 727–729.
- [41] KERNIE SG, ERWIN TM, PARADA LF. Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res* 2001; **66**: 317–326.
- [42] KOLB B, BROWN R, WITT-LAJEUNESSE A, GIBB R. Neural compensations after lesion of the cerebral cortex. *Neural Plasticity* 2001; **8**: 1–16.
- [43] KORDOWER JH, FREEMAN TB, SNOW BJ, VINGERHOETS FJ, MUFSON EJ, SANBERG PR, HAUSER RA, SMITH DA, NAUERT GM, PERL DP, ET AL. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *Engl J Med* 1995, **332**:1118–1124.
- [44] KORDOWER JH, FREEMAN TB, CHEN EY, MUFSON EJ, SANBERG PR, HAUSER RA, SNOW B, OLANOW CW. Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998, **13**: 383–393.
- [45] LI Y, CHEN J, CHEN XG, WANG L, GAUTAM SC, XU YX, KATAKOWSKI M, ZHANG LJ, LU M, JANAKIRAMAN N, CHOPP M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; **59**: 514–523
- [46] LIU S, QU Y, STEWART TJ, CHAKRABORTY S, HOLEKAMP TF, MCDONALD JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6126–6131.
- [47] LU D, SANBERG PR, MAHMOOD A, LI Y, WANG L, SANCHEZ-RAMOS J, CHOPP M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 2002; **11**: 275–281.
- [48] MALATESTA P, HARTFUSS E, GOTZ M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000; **127**: 5253–5263.
- [49] MAYER-PROSCHEL M, KALYANI AJ, MUJTABA T, RAO MS. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 1997; **19**: 773–785.
- [50] McKAY R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; **276**: 66–71.
- [51] McKAY R. Stem cells – hype and hope. *Nature* 2000; **406**: 361–364.
- [52] MEZEY E, KEY S, VOGELSANG G, SZALAYOVA I, LANGE GD, CRAIN B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1364–1369.
- [53] MODO M, REZAI P, HEUSCHLING P, PATEL S, MALE DK, HODGES H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res* 2002; **958**: 70–82.
- [54] NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S, HATANO O, KAWAHARA N, TAMURA A, KIRINO T, NAKAFUKU M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; **110**: 429–437.
- [55] NISHINO H, BORLONGAN CV. Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog Brain Res* 2000; **127**: 461–476.
- [56] NOCTOR SC, FLINT AC, WEISSMAN TA, DAMMERMAN RS, KRIEGSTEIN AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001; **409**: 714–720.
- [57] OLANOW CW, KORDOWER JH, FREEMAN TB. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 102–109.
- [58] PALFIS, CONDE F, RICHE D, BROUILLET E, DAUTRY C, MITTOUX V, CHIBOIS A, PESCHANSKI M, HANTRAYE P. Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 1998; **4**: 963–966.

- [59] PHILPOTT LM, KOPYOV OV, LEE AJ, JACQUES S, DUMA CM, CAINE S, YANG M, EAGLE KS. Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations. *Cell Transplant* 1997; **6**: 203–212.
- [60] PICCINI P, BROOKS DJ, BJORKLUND A, GUNN RN, GRASBY PM, RIMOLDI O, BRUNDIN P, HAGELL P, REHNCRONA S, WIDNER H, LINDVALL O. Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 1999; **2**: 1137–1140.
- [61] PROCKOP DJ, AZIZI SA, PHINNEY DG, KOPEN GC, SCHWARZ EJ. Potential use of marrow stromal cells as therapeutic vectors for diseases of the central nervous system. *Prog Brain Res* 2000; **128**: 293–297.
- [62] REMPE DA, KENT TA. Using bone marrow stromal cells for treatment of stroke. *Neurology* 2002; **59**: 486–487.
- [63] ROGISTER B, BEN-HUR T, DUBOIS-DALCQ M. From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 1999; **14**: 287–300.
- [64] SANBERG PR, WILLING AE, CAHILL DW. Novel cellular approaches to repair of neurodegenerative disease: from Sertoli cells to umbilical cord blood stem cells. *Neurotox Res* 2002; **4**: 95–101.
- [65] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, i wsp. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; **164**: 247–256.
- [66] SANCHEZ-RAMOS JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 880–893.
- [67] SAVITZ SL, MALHOTRA S, GUPTA G, ROSENBAUM DM. Cell transplants offer promise for stroke recovery. *J Cardiovasc Nurs* 2003; **18**: 57–61.
- [68] SHIHABUDDIN LS, HORNER PJ, RAY J, GAGE FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2000; **20**: 8727–8735.
- [69] SINDEN JD, RASHID-DOUBELL F, KERSHAW TR, NELSON A, CHADWICK A, JAT PS, NOBLE MD, HODGES H, GRAY JA. Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immortalized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischaemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience* 1997; **81**: 599–608.
- [70] SUHONEN JO, PETERSON DA, RAY J, GAGE FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature* 1996; **383**: 624–627.
- [71] SVENDSEN CN, CALDWELL MA, SHEN J, TER BORG MG, ROSSER AE, TYERS P, KARMIOL S, DUNNETT SB. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997; **148**: 135–146.
- [72] SVENDSEN CN, SKEPPER J, ROSSER AE, TER BORG MG, TYRES P, RYKEN T. Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; **99**: 253–258.
- [73] TODA H, TAKAHASHI J, IWAKAMI N, KIMURA T, HOKI S, MOZUMI-KITAMURA K, ONO S, HASHIMOTO N. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett* 2001; **316**: 9–12.
- [74] WEISS ML, MITCHELL KE, HIX JE, MEDICETTY S, EL-ZARKOUNY SZ, GRIEGER D, TROYER DL. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol* 2003; **182**: 288–299.
- [75] WILLING AE, LIXIAN J, MILLIKEN M, POULOS S, ZIGOVA T, SONG S, HART C, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 2003a; **73**: 296–307.
- [76] WILLING AE, VENDRAME M, MALLERY J, CASSADY CJ, DAVIS CD, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant* 2003b; **12**: 449–454.
- [77] WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; **61**: 364–370.
- [78] WOODBURY D, REYNOLDS K, BLACK IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 908–917.
- [79] YANDAVA BD, BILLINGHURST LL, SNYDER EY. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7029–7034.
- [80] ZIGOVA T, SONG S, WILLING AE, HUDSON JE, NEWMAN MB, SAPORTA S, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 2002; **11**: 265–274.

OPTIMALIZACJA TECHNIKI POZYSKIWANIA KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH OD HEPARYNIZOWANYCH DAWCÓW NARZĄDÓW (HDN)*

AN OPTIMIZATION OF ISOLATION OF EARLY HEMATOPOIETIC
CELLS FROM HEPARINIZED CADAVERIC ORGAN DONORS (HCDOD)

Bogusław MACHALIŃSKI

Zakład Patologii Ogólnej, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

Streszczenie. Ważnym źródłem organów unaczynionych i tkanek do celów transplantologicznych są heparynizowani dawcy narządów (HDN). Stale rosnąca liczba pobrań narządowych oraz potencjalna łatwość, z jaką można pozyskiwać od HDN komórki szpiku wymogła potrzebę opracowania efektywnej metody pobierania od nich i zabezpieczania KKM, pod kątem ich wykorzystania do celów transplantologicznych. Dotychczas opisywane metody pobierania szpiku kostnego od dawców narządów, którzy nie otrzymywali antykoagulantu przed pozyskaniem szpiku, były czasochłonne, technicznie skomplikowane i co się z tym wiąże drogie. Fakt rutynowego podawania heparyny dawcom narządów sprawia, że szpik w ich jamach szpikowych pozostaje płynny. Można go więc pozyskiwać drogą prostej aspiracji. Przedmiotem badań w prezentowanej pracy były niektóre aspekty optymalizacji pozyskiwania i przechowywania komórek od HDN, w tym wybór odpowiedniego czynnika przeciwkrzepliwego. Powinien on być dobrany w ten sposób, aby do minimum ograniczyć ewentualne niekorzystne działanie wobec komórek krwiotwórczych. Najlepszym antykoagulantem do pobierania i krótkotermiowego przechowywania szpiku okazał się być roztwór heparyny. Poddano następnie ocenie media stosowane do przechowywania komórek żywych. Wykazano, iż optymalną pożywką w medium do pobierania szpiku od HDN jest RPMI. Stwierdzono ponadto większą przeżywalność komórek krwiotwórczych przechowywanych w pojemnikach z dostępem powietrza, w porównaniu z tymi, które umieszczono w warunkach próżni. Obecność czystego tlenu jest natomiast toksyczna dla komórek. Komórki szpiku pobieranego od HDN powinny być transportowane w pojemnikach zawierających powietrze. Oceniając wpływ dojrzałych elementów morfotycznych krwi w zawiesinie na przeżywalność przechowywanych komórek szpiku kostnego stwierdzono, że obecność erytrocytów i granulocytów wykazuje korzystny wpływ na przeżywalność komórek progenitorowych szpiku od HDN podczas przechowywania w 4°C. Opisane wyniki mogą w niedalekiej przyszłości przyczynić się do pod-

*Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2005 jako projekt badawczy zamawiany PBZ-501/Z/13/5/2002

jęcia szerokiej inicjatywy organizowania banków ludzkich komórek hematopoetycznych pozyskiwanych od HDN. Utworzenie takich ośrodków w znaczącym stopniu mogłoby poszerzyć dostępność komórek krwiotwórczych wykorzystywanych do celów klinicznych.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste krwiotwórcze (KKM) i ukierunkowane, heparynizowani dawcy narządów (HDN).

Abstract. The heparinized cadaveric organ donors (HCOD) are an important source of vascularized organs for transplantation purposes. The demand for a new potential sources of hematopoietic stem cells (HSC) for transplantations and gene therapy is growing. Hence the HCODs could be treated as the donors of HSCs, which unfortunately are wasted at this moment. However, few attempts have been reported to use cadavers, but not heparinized, as donors of hemopoietic stem cells. The described methods were time-consuming, technically complicated and relatively expensive. Since HCOD are heparinized before an organ donation, blood in their bone marrow cavities remains liquid and can be easily aspirated. In our studies we evaluated some selected aspects of optimization of isolation of early hematopoietic cells from HCOD. We determined that heparin was the best anticoagulant, useful for obtaining and short-term storage of marrow cells. We also found that the least toxicity to progenitor cells derived from HCODs, from different culture media evaluated, had RPMI. Our other findings indicated that the presence of air in the container used for blood collection led to better protections of the hematopoietic cells. On the contrary, the presence of higher concentration of oxygen in the container was toxic and should be avoided. We found the positive influence of erythrocytes and granulocytes on the clonogenicity of early hematopoietic cells short-term stored at 4°C. We believe that our findings will support the idea of calling for an international initiative to create bank of hematopoietic stem cells obtained from heparinized cadaveric organ donors, which could be employed in transplantology and gene therapy.

Key words: hematopoietic stem and progenitor cells, heparinized cadaveric organ donors.

WSTĘP

Przeszczepianie ludzkich komórek macierzystych (KKM) staje się obecnie metodą ratującą życie wielu pacjentom, a dzięki postępom biologii molekularnej oraz terapii genowej istnieje realna szansa na wyleczenie wielu osób, do tej pory uważanych za nieuleczalnie chorych. Wzrasta liczba ośrodków transplantacyjnych stosujących ten sposób leczenia [8, 12, 24]. Istotnym ograniczeniem w przeprowadzaniu większej liczby przeszczepień, zwłaszcza allogenicznych, jest jednak dalece niewystarczająca liczba potencjalnych dawców. Ze względu na fakt, iż komórki szpikowe dawcy i biorcy muszą być zgodne w układzie HLA, tylko dla części potencjalnych biorców istnieje szansa dobrania odpowiednich, niespokrewnionych dawców. Powstały w związku z tym specjalne rejestry osób pragnących zostać honorowymi dawcami szpiku. Pomimo tego iż obejmują parę milionów ludzi, mogą zapewnić zgodnego dawcę jedynie dla około 30% populacji [8]. Zapotrzebowanie jest duże, natomiast obecny stan dostępności niewystarczający.

Głównym źródłem narządów i tkanek unaczynionych do przeszczepień są obecnie heparynizowani dawcy narządów (HDN) [3, 29]. Liczba tych transplantacji znacząco rosła w ostatnim czasie [3], jednak komórki krwiotwórcze od HDN są w chwili obecnej niewykorzystane. Wszyscy dawcy są typowani w układzie HLA. Wykonywany jest u

nich rutynowo profil testów na obecność chorób przenoszonych drogą krwi. Dobrze znana jest przyczyna zgonu i faktyczny stan wydolności wszystkich układów. Odpowiednie prowadzenie chorego i wykonanie podstawowych badań pozwala na wczesne wychwycenie potencjalnej dysfunkcji w obrębie układu krwiotwórczego. Wszystko to ma olbrzymie znaczenie, także z ekonomicznego punktu widzenia. Przed dokonaniem pobrania narządów wewnętrznych dawcy ci są rutynowo heparynizowani. Krew znajdująca się w ich jamach szpikowych pozostaje więc płynna i daje się łatwo pozyskać drogą aspiracji. W związku z powyższym, komórki krwiotwórcze szpiku kostnego pobierane od heparynizowanych dawców narządów i przechowywane w specjalnie stworzonych do tego celu bankach mogłyby stanowić doskonałe uzupełnienie listy honorowych dawców szpiku [15, 16, 17].

Komórki krwiotwórcze pozyskane od dawców narządów są materiałem pełnowartościowym, jeśli chodzi o funkcję odnowy krwiotworzenia po ich przeszczepieniu. Podjęto już takie próby u dzieci. Pierwszą opisaną, przeprowadzono w 1986 roku. Wtedy to 12-letniemu chłopcu przetoczono komórki hematopoetyczne jego zmarłego na zawał serca ojca [1]. W ostatnim czasie (1998 r.) ukazało się doniesienie o udanym przeszczepie komórek krwiotwórczych u dziecka z chorobą Gauchera, któremu przeszczepiono KKM, pobrane po śmierci od jego rodzeństwa [9].

Podjęte wcześniej próby pozyskania tkanki szpikowej do przeszczepień ze zwłok przyniosły wymierny efekt jedynie w zakresie metodycznym. Należy podkreślić, że do tej pory szpik kostny pozyskiwano od dawców narządów, którzy nie byli heparynizowani [7, 19, 23, 25, 26]. Skomplikowana technicznie i droga obróbka materiału kostnego, który był pobierany w tym przypadku oraz zwiększone ryzyko zakażenia ograniczyły praktyczne zastosowanie tej metody. Techniki te powodują ponadto rozległe uszkodzenia i deformacje ciała dawcy, co z kolei nie jest do końca aprobowane ze względów etycznych [7, 25].

W metodzie, którą opracował nasz zespół [15, 16, 17, 18], oparliśmy się na fakcie, że dawcy narządów są rutynowo heparynizowani przed zatrzymaniem krążenia i rozpoczęciem procedur mających na celu pozyskanie organów unaczynionych do przeszczepu. Tak więc szpik w ich jamach szpikowych pozostaje płynny i tym samym łatwo dostępny drogą aspiracji. W naszych dotychczasowych badaniach wykazaliśmy m.in., iż wczesne komórki krwiotwórcze mogą być skutecznie pozyskiwane od heparynizowanych dawców narządów, przechowywane oraz bezpiecznie wykorzystywane do celów naukowo-badawczych i transplantacyjnych [13, 15, 17, 18].

Celem niniejszej pracy była optymalizacja procedur technicznych pozyskiwania nieembrionalnych komórek macierzystych pochodzących od heparynizowanych dawców narządów przez: wybór najodpowiedniejszego antykoagulantu oraz pożywki; określenie bezpiecznej temperatury (4°C v. pokojowa) i czasu przechowywania zawiesiny pobranych komórek szpiku; wpływu obecności powietrza oraz erytrocytów i leukocytów w pojemniku służącym do przechowywania szpiku na żywotność i potencjał proliferacyjny pozyskiwanych komórek.

POZYSKIWANIE KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO OD HEPARYNIZOWANYCH DAWCÓW NARZĄDÓW

Badania przeprowadzono na komórkach hematopoetycznych ludzkiego szpiku kostnego, które pozyskano od 70 heparynizowanych dawców narządów. Średni wiek dawców wynosił 40,4 lat. Liczba kobiet: 24, mężczyzn: 46. Przyczyną śmierci w 35 przypadkach był uraz czaszkowo-mózgowy, w 27 krwotok mózgowy, w 4 udar niedokrwienny mózgu, w 2 powikłania po odniesionym urazie wielonarządowym. Ponadto w 1 przypadku zatrucie barbituranami i 1 samobójstwo. Kwalifikacja dawcy odbywała się na podstawie wyniku protokołu stwierdzającego u niego śmierć pnia mózgu [28]. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej. Każdorazowo, poza potwierdzeniem braku sprzeciwu dawcy w Centralnym Rejestrze, ze względów etycznych starano się uzyskać zgodę jego najbliższej rodziny.

Od każdego dawcy narządów pozyskiwano szpik kostny po zatrzymaniu krążenia (odłączeniu od respiratora). Zabieg pobierania szpiku przeprowadzano na bloku operacyjnym. Przed pozyskaniem narządów wewnętrznych podawano dawcy doustnie heparynę w dawce 25 000 U (Polfa, Kutno, Polska), a następnie odłączano go od respiratora. Po pobraniu innych narządów (serce, nerki, wątroba) przez zespoły chirurgiczne, lecz zawsze przed pobraniem kości, wykorzystując dostęp brzuszny (od strony jamy otrzewnowej) dokonywano wielokrotnych nakłuć talerza biodrowego oraz trzonów kręgów lędźwiowych za pomocą igieł typu Jamshidi (*Medical Device Technologies Inc. USA*), aspirując do 10 ml szpiku. Za każdym razem zmieniano miejsce wkłucia i przepłukiwano igłę punkcyjną jałowym roztworem heparyny [17].

Wszystkie powyższe procedury przeprowadzone były w warunkach pełnej jałowości. Jeśli zachodziło podejrzenie uszkodzenia bariery jelitowej, przed rozpoczęciem procedury pobierania jamę otrzewnową dokładnie płukano jałowym roztworem cefuroksymu (Biofuroksym, Bioton, Polska) i metronidazolu (Polpharma, Polska), lub wodnym roztworem preparatu Braunol (B. Braun. Melsungen AG, Niemcy). Czas między zatrzymaniem krążenia a pobraniem materiału nie przekraczał 120 min.

Niezwłocznie po dokonanej aspiracji, komórki szpiku kostnego zawieszano w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS, pH 7,3) zawierającym 20 U/ml heparyny (Gibco BRL, USA) i umieszczano w probówkach polipropylenowych o pojemności 50 ml (Fisher, USA) oraz w jałowych, nietoksycznych, niepyrogennych, polietylenowych workach (Japan Medical Supply, Singapore) o pojemności 300 ml przeznaczonych do przechowywania krwi obwodowej i jej preparatów. Tak zabezpieczony materiał komórkowy po szczelnym zamknięciu umieszczany był w przenośnej chłodziarce (Quattro Elle S.p.A, Urganio, Włochy) utrzymującej temperaturę 4–8°C i transportowany następnie do laboratorium w celu dalszej preparatyki.

Izolacja frakcji A⁺T⁺KJS komórek szpiku kostnego pobranego od HDN. Komórki szpiku zawieszano w heparynizowanej pożywce Iscove'a (Gibco, USA) po czym izolowano z nich frakcję komórek jednojądrzastych (KJ) [14], pozbawiono

komórek adherentnych (A⁺KJ) i limfocytów T (A⁺T⁺KJ), jak opisano [21]. Żywotność komórek oceniano za pomocą testu z 0,5% błękitem trypanu. Frakcja A⁺T⁺KJ stanowiła materiał wyjściowy do dalszych badań.

Badania mikrobiologiczne. W każdym przypadku z pobieranego szpiku wykonywano posiewy mikrobiologiczne na obecność flory bakteryjnej tlenowej i beztlenowej.

Testy klonogenne. Potencjał klonogeny izolowanych komórek oceniany był w hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro*, jak opisano [21]. Wzrost kolonii granulocytowo-monocytowych (CFU-GM, ang. *Colony Forming Unit of Granulocytes and Monocytes*) stymulowano GM-CSF (granulocytowo-monocytowy czynnik wzrostu, 5 ng/mL) + IL-3 (interleukina-3, 20 U/mL), natomiast wzrost kolonii erytroidalnych (BFU-E, ang. *Burst Forming Unit of Erythrocytes*) EPO (erytropoetyna, 5 U/mL) + KL (Kit Ligand, 100 ng/mL). Kolonie liczono w mikroskopie odwróconym 11 dnia (CFU-GM) oraz 14 dnia hodowli (BFU-E).

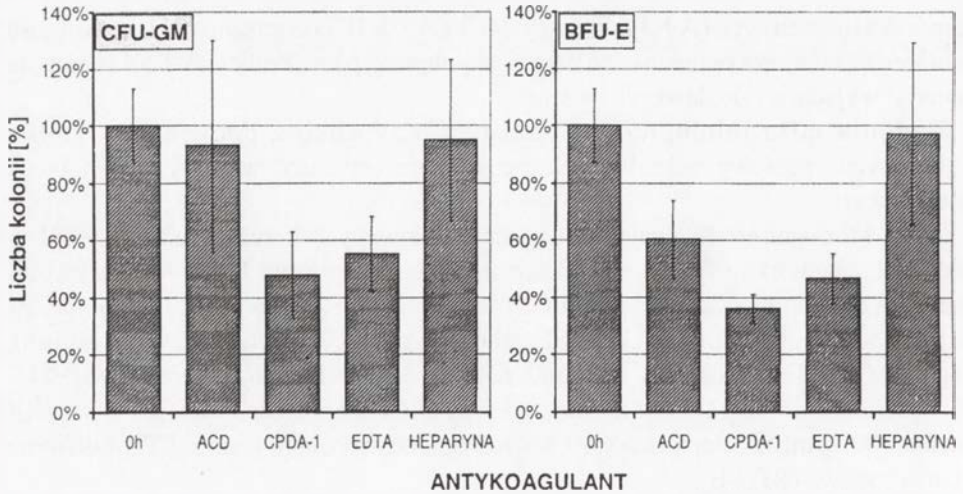
Analiza statystyczna. Wyniki poddano analizie statystycznej posługując się arkuszem kalkulacyjnym MS Excel v.97. Różnice w liczbie wytworzonych kolonii w sześciu niezależnych doświadczeniach porównano testem t-Studenta dla prób niesparowanych. Wartości $p < 0,05$ przyjęto za znamienne statystycznie.

OCENA RODZAJU ANTYKOAGULANTU ZASTOSOWANEGO DO POBIERANIA I KRÓTKOTERMINOWEGO PRZECHOWYWANIA SZPIKU OD HEPARYNIZOWANYCH DAWCÓW NARZĄDÓW

Po pobraniu komórek szpiku kostnego zachodzi potrzeba umieszczenia go w odpowiednich warunkach termicznych, optymalnym środowisku zawierającym zarówno najmniej toksyczny antykoagulant, jak i starannie dobrane medium. Ekspozycja na nieznacznie nawet toksyczny antykoagulant stanowiłaby więc zagrożenie dla całego procesu aplikacji klinicznej pozyskiwanych komórek krwiotwórczych. Nie mniej istotna wydaje się być dostępność tlenu w środowisku. Konieczność krótkoterminowego przechowania komórek szpiku wynika z potrzeby jego transportu do laboratorium, gdzie podlegałby dalszej preparacji i ewentualnie mrożeniu. Warunki, w jakich są one utrzymywane po pobraniu, stanowią jeden z czynników krytycznych w całym procesie transplantacyjnym.

W badaniach własnych uwzględniono roztwory czterech antykoagulantów najczęściej stosowanych w diagnostyce i klinice hematologicznej:

- ◆ Heparyna (Gibco, USA) w stężeniu 5000 U/ml,
- ◆ cytrynianowy roztwór dekstrozy (*Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, USP*) – ACD (Baxter Healthcare Corporation, USA),
- ◆ cytrynianowy roztwór fosforanowo-dekstrozowo-adeninowy z dodatkiem gluko-



RYCINA 1. Średnia liczba kolonii utworzonych przez klonogenne CFU-GM oraz BFU-E pozyskiwanych ze szpiku przechowywanego w roztworach poszczególnych antykoagulantów

zy (*Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution with glucose*, USP) – *CPDA-1* (Baxter Healthcare Corporation, USA),

- ◆ wersenian potasowy – *EDTA* (Lubelskie Przedsiębiorstwo Przemysłowo-Handlowe Odczynniki Chemiczne, Polska) – w stężeniu 1%.

Roztwory badanych substancji przygotowano na podłożu buforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS, pH 7,3) z dodatkiem penicyliny ze streptomycyną (Gibco BRL, USA) i przechowywano w temp. 4°C. Komórki szpiku kostnego, bezpośrednio po aspiracji, zawieszano w przygotowanym roztworze antykoagulantu w probówkach z polipropylenu (Fisher, USA), które niezwłocznie umieszczano w temp. 4°C i inkubowano przez 24 h. Po tym czasie przeprowadzano izolację komórek jednojądrzastych i oceniano potencjał proliferacyjny.

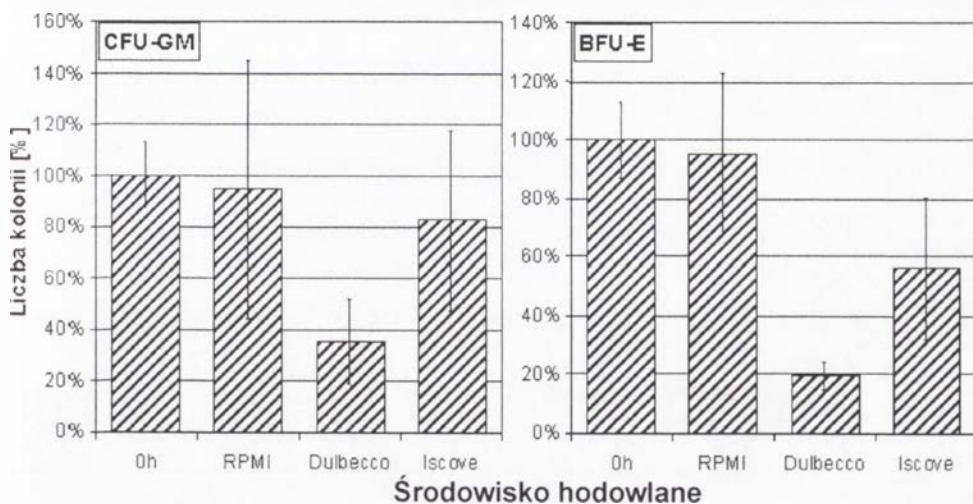
Na rycinie 1 przedstawiono średnią liczbę kolonii utworzonych przez klonogenne CFU-GM oraz BFU-E pozyskiwane ze szpiku przechowywanego w roztworach poszczególnych antykoagulantów. Z uwidocznionych na wykresie danych wynika, że najbezpieczniejszym do pobierania i krótkoterminowego przechowywania komórek szpiku jest roztwór heparyny. Porównywalnie dobrym antykoagulantem, szczególnie wobec CFU-GM, okazał się być roztwór ACD. Natomiast względną toksycznością wobec komórek ukierunkowanych szpiku cechowały się roztwory EDTA i CPDA-1 ($p < 0,05$).

OCENA RODZAJU POŻYWKI STOSOWANEJ DO KRÓTKOTERMINOWEGO PRZECHOWYWANIA KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO POBRANEGO OD HDN

Komórki szpiku kostnego, bezpośrednio po ich aspiracji, winny być zawieszane w medium zapewniającym im właściwe środowisko jonowe, jak również dostęp do podstawowych substratów niezbędnych w procesie przemiany materii. Skład pożywki jest jednym z podstawowych czynników wpływających na przeżywalność hematopoetycznych komórek ukierunkowanych i macierzystych [22]. Przypatrując się danym z piśmiennictwa można zauważyć, iż poszczególne ośrodki stosują różne rodzaje pożywek i dodatków wzbogacających ich skład. Rodzaj wykorzystywanej pożywki zależy od metodyki wypracowanej i ustalonej przez dany zespół [4, 6, 27]. Gotowe media mają stały i określony przez producenta skład [10]. Z reguły zawierają substancję o działaniu buforującym, jaką jest na przykład dwuwęglan sodu. Niektóre zawierają glukozę i L-glutaminę. W naszych badaniach ocenie poddano trzy rodzaje pożywek stosowanych i preferowanych w ostatnim czasie w hematologii doświadczalnej do krótkoterminowego przechowywania materiału komórkowego:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DME),
- *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM),
- *RPMI-1640 Media*.

Do poszczególnych rodzajów mediów (DME, IMDM, RPMI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, BRD) dodawano roztwór heparyny (Gibco BRL, USA) oraz protekcyjnie dodatek penicyliny ze streptomycyną (Gibco BRL, USA) i przechowywano



RYCINA 2. Porównanie wpływu różnych rodzajów pożywek na klonogenność CFU-GM oraz BFU-E szpiku przechowywanego w temp. 4°C przez 24 h

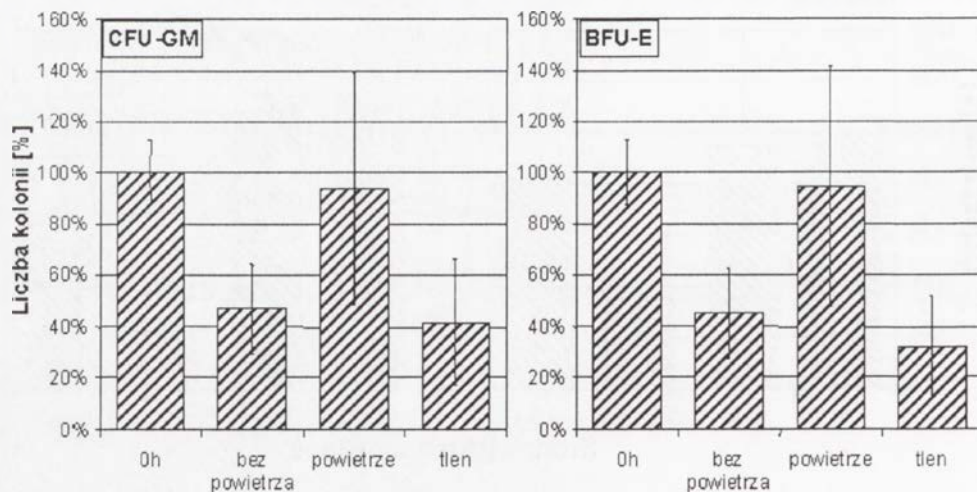
w temp. 4°C. Wszystkie badane roztwory przygotowywano w dniu pobrania szpiku od HDN i przechowywano w temp. 4°C w jałowych probówkach z polipropylenu (Fisher, USA). Komórki szpiku kostnego bezpośrednio po aspiracji zawieszano w tak przygotowanych roztworach i niezwłocznie umieszczano w temp. 4°C. Były one inkubowane w tych warunkach przez 24 h. Po tym czasie przeprowadzano izolację komórek jednojądrzastych i oceniano potencjał proliferacyjny.

Na rycinie 2 przedstawiono dane porównujące wpływ różnych rodzajów pożywek na klonogenność CFU-GM oraz BFU-E szpiku przechowywanego w temp. 4°C przez 24 h. Jak wynika z ryciny 2 RPMI i pożywka Iscove nie wpływały ujemnie na potencjał proliferacyjny CFU-GM oraz BFU-E. Wyraźny spadek klonogenności odnotowano natomiast w przypadku komórek szpiku przechowywanych w pożywce Dulbecco ($p < 0,05$).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż IMDM, a zwłaszcza RPMI-1640 spełniają założone kryteria bezpiecznego, krótkoterminowego przechowywania szpiku kostnego pobieranego od HDN.

OCENA KRÓTKOTERMINOWEGO PRZECHOWYWANIA KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO W ATMOSFERZE CZYSTEGO TLENU ORAZ W OBECNOŚCI I BEZ DOSTĘPU POWIETRZA

Poza substratami odżywczymi i protekcyjnymi, jakie zawierać powinno środowisko, w którym znajdują się przechowywane komórki szpiku kostnego, istotną rolę odgrywać może również ilość i rodzaj gazu w przestrzeni wolnej naczynia czy worka, w którym przechowuje się pobrany materiał komórkowy. Fakt ten skłaniał do przeprowadzenia badania, w którym szpik tuż po pobraniu umieszczano w jałowych, nietoksycznych workach zawierających heparynizowaną pożywkę.



RYCINA 3. Wzrost klonogennych CFU-GM oraz BFU-E szpiku przechowywanego w środowisku wzbogaconym w tlen, z obecnością oraz bez obecności powietrza

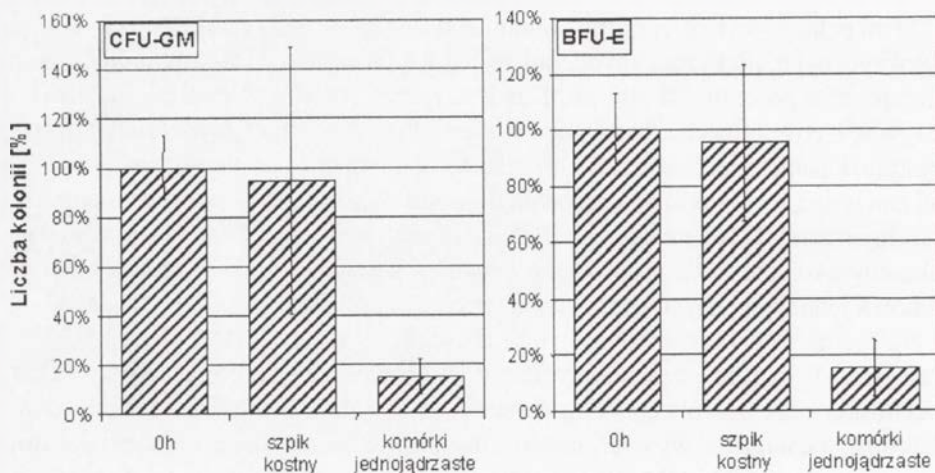
20 ml pełnego szpiku, zaraz po pobraniu od dawcy, umieszczano w trzech jałowych, nietoksycznych, niepyrogennych, polietylenowych workach (Japan Medical Supply, Singapore) o pojemności 300 ml. Każdy z tych worków zawierał heparynizowaną pożywkę Iscove (stężenie heparyny 20 U/ml). Pierwszy z nich wypełniano następnie czystym tlenem, drugi powietrzem, trzeci natomiast pozbawiano przestrzeni powietrznej nad zawiesiną komórek szpiku uzyskując warunki próżniowe. Wszystkie pojemniki po szczelnym zamknięciu umieszczane były niezwłocznie w temp. 4°C. Po upływie 24 h, po dokładnym rozmieszaniu, aspirowano zawartość kolejnych worków, izolowano frakcję komórek jednojądrzastych i oceniano ich potencjał proliferacyjny.

Na rycinie 3 przedstawiono wyniki dotyczące wzrostu klonogennych CFU-GM oraz BFU-E szpiku przechowywanego w środowisku wzbogaconym w tlen, z obecnością oraz bez obecności powietrza. Jak wynika z prezentowanych danych, obecność powietrza wywierała najkorzystniejszy wpływ na wzrost komórek progenitorowych CFU-GM i BFU-E. Obecność czystego tlenu wpływała uszkadzająco na progenitory zarówno linii mieloidalnej, jak i erytroidalnej ($p < 0,05$).

Komórki utrzymywane poza organizmem żywym podlegają procesowi apoptozy. Naszym celem jest stworzenie warunków umożliwiających opóźnienie tempa tego procesu bądź też, o ile to jest możliwe, jego zahamowanie. Najlepszą proliferację wykazywały komórki szpiku przechowywane w zawieszynie z dostępem powietrza. Jego obecność może stwarzać pewną ochronę w razie spadku pH środowiska medium komórkowego. Brak powietrza niekorzystnie wpływa na przeżywalność komórek hematopoetycznych szpiku kostnego pobieranego od HDN. Jest to bardzo ważne w aspekcie narażenia komórek szpiku, które już w organizmie dawcy po zatrzymaniu krążenia są poddane hipoksji, a czas ten może zostać przedłużony do kilku nawet godzin w trakcie pozyskiwania i transportu do laboratorium. Obecność czystego tlenu działa natomiast wręcz toksycznie i należy bezwzględnie unikać dodawania go w tej postaci do pojemników, w których przechowuje się szpik kostny. Może to być związane z tworzeniem się wolnych rodników nadtlenkowych, które odpowiadają za uszkodzenie struktur DNA, zniszczenie integralności błon komórkowych czy też inaktywację niektórych ważnych enzymów komórkowych [11, 20]. Należy wspomnieć, iż obecnie specjalnie przygotowywane worki do pobierania krwi obwodowej, krwi pępowinowej i szpiku kostnego nie zawierają powietrza.

OCENA OBECNOŚCI ERYTROCYTÓW I GRANULOCYTÓW W PRZECHOWYWANEJ ZAWIESINIE

W tym celu pobrany szpik kostny dzielono na dwie równe objętości. Z pierwszej izolowano komórki jednojądrzaste, które następnie umieszczano w medium Iscove wzbogaconym 10% surowicą cielęcą (BCS). Drugą część zawieszyny komórkowej pozostawiano w niezmienionej postaci. Obydwie próbki umieszczano w lodówce na 24 h. Po tym czasie z próbki zawierającej zawiesinę pełnego szpiku izolowano frakcję



RYCINA 4. Średnia liczba kolonii utworzonych przez klonogenne CFU-GM i BFU-E pozyskiwane ze szpiku pełnego oraz frakcji komórek jednojądrzastych przechowywanych przez 24 h w temp. 4°C

komórek jednojądrzastych. Następnie oceniano potencjał proliferacyjny obydwóch frakcji badanych komórek.

Na rycinie 4 przedstawiono średnią liczbę kolonii utworzonych przez klonogenne CFU-GM i BFU-E pozyskiwane ze szpiku pełnego oraz frakcji komórek jednojądrzastych przechowywanych przez 24 h w temp. 4°C. Z przedstawionych danych wynika, że obecność erytrocytów i granulocytów wywierała korzystny wpływ na komórki ukierunkowane mielo- i erytropoezy. Liczba kolonii utworzonych zarówno przez CFU-GM, jak i BFU-E przechowywanych we frakcji komórek jednojądrzastych była znacznie mniejsza niż przechowywanych w pełnym szpiku ($p < 0,05$).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż w obecności erytrocytów i granulocytów w zawieszynie, komórki ukierunkowane mielo- i erytropoezy szpiku pozyskiwanego od HDN lepiej znoszą krótkotrwałe przechowywanie. Znajduje to swoje potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na szpiku kostnym pozyskiwanym od zdrowych dawców przez inne zespoły, które wykazały ochronne działanie erytrocytów na przeżywalność klonogennych komórek w zawieszynie. Erytrocyty mają wychwytywać wolne rodniki tlenu powstające podczas rozpadu monocytów i granulocytów [5].

PODSUMOWANIE

Niezadowalająca sytuacja w zakresie dostępności komórek hematopoetycznych do przeszczepień zmusza do poszukiwania nowych alternatywnych źródeł tych komórek. Dzięki postępowi technik transplantologicznych w wyniku poszukiwań nowych źródeł komórek macierzystych pojawiło się nowe bogate źródło tych komórek. Są nim

heparynizowani dawcy narządów. Równolegle z pobraniem odpowiednich narządów wewnętrznych można zabezpieczać od nich szpik kostny do celów transplantologicznych.

Szpik pobierany od HDN pozostaje w stanie płynnym i nie ma znamion infekcji, o ile aspirację przeprowadza się do 2 godzin po zatrzymaniu krążenia. Jest bogaty w komórki jednojądrzaste oraz komórki progenitorowe, które odznaczają się dobrą żywotnością [15, 17, 18]. Komórki szpiku pozyskiwane od HDN są materiałem pełnowartościowym, spełniającym kryteria wykorzystania go do celów zarówno doświadczalnych, jak i klinicznych.

Rozwinięcie sprawnie działającego systemu zespołów pozyskujących materiał komórkowy od HDN pozwoliłoby w niedługim czasie na zgromadzenie odpowiedniej liczby różnych antygenowo preparatów KKM, które zapewniłyby swobodny dobór komórek do przeszczepień allogenicznych. Potrzebą chwili stają się więc badania nad optymalizacją metod pozyskiwania, przechowywania i przesyłania komórek szpiku. Prezentowana praca jest krokiem w kierunku opracowania standardów postępowania w tym zakresie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BLAZAR BR, LASKY LC, PERENTESIS JP, WATSON KV, STEINBERG SE, FILIPOVICH AH, ORR HT, RAMSAY NKC. Successful donor cell engraftment in a recipient of bone marrow from cadaveric donor. *Blood* 1986; **67**: 1655–1660.
- [2] BLUME KG, PETZ LD. Clinical bone marrow transplantation. Churchill, Livingstone, New York 1983.
- [3] BOHATYREWICZ R. Zagadnienia towarzyszące przeszczepianiu narządów. *Anestezjol Intens Ter* 1999; (suppl. 1): 3–13.
- [4] BURNETT AK, HILLS C, ALCORN MJ, SHEEHAN T, MCDONALD GA, BANHAM SW. Hematological reconstruction following high dose and supralethal chemo-radiotherapy using stored, non-cryopreserved autologous bone marrow. *Br J Haematol* 1983; **54**: 309–316.
- [5] CIAVARELLA D. Hematopoietic stem cell processing and storage. *Biotechnology* 1991; **19**: 317–349.
- [6] DELFOGE A, RONGE-COLLARD E, STRYCKMANS P, SPIRO T, MALARME MA. Granulocyte-Macrophage progenitor cell preservation at 4°C. *Brit J Haematol* 1983; **53**: 49–54.
- [7] FONTES P, RAO AS, RICORDI C, RYBKA WB, DODSON FS, BROZNIC B, LU L, ZEEVI A, THOMSON AW, VASKO C, SESKEY T, CARROLL PB, FUNG JJ, STARZL TE. Human bone marrow obtained from vertebral bodies: cell isolation phenotyping, progenitor assay and transplantation. *Transplant Proc* 1994; **25**: 3406–3407.
- [8] JĘDRZEJCZAK WW. Przeszczepianie szpiku kostnego. W: Fizjologia Krwi. PWN 1998; XX: 352–368.
- [9] KAPELUSHNIK J, AKER M, PUGATSCH T, SAMUEL S, SLAVIN S. Bone marrow transplantation from a cadaveric donor. *Bone Marrow Transplant* 1998; **21**: 857–858.
- [10] Katalog firmy „SIGMA”. Cell culture 1998: 203–272.
- [11] KOLLER MR, BENDER JG, MILLER WM, PAPOUTSAKIS T. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 1992; **20**: 264–270.
- [12] LISIEWICZ J. Przeszczepianie szpiku. W: Hematologia kliniczna (red. K. Janicki), PZWL 1992; 48: 657–668.
- [13] MACHALIŃSKI B, GONTAREWICZ A, RATAJCZAK MZ. Morphological analysis of the bone marrow biopsies derived from heparinized cadaveric organ donors before and after disconnecting from the respirator. *Ann Transplant* 2001; **6**: 48–52.

- [14] MACHALIŃSKI B, HONCZARENKO M, GONTAREWICZ A, RATAJCZAK MZ. Izolacja ludzkich komórek mononuklearnych ze szpiku kostnego, krwi obwodowej i pępowinowej za pomocą roztworu Ficoll-Paque (Pharmacia) i Gradisolu L ((Polfa). Ocena porównawcza. *Pol Arch Med Wewn* 1998; **99**: 15–23.
- [15] MACHALINSKI B, KIJOWSKI J, MARLICZ W, GONTAREWICZ A, MARKIEWSKI M, PACZKOWSKI M, KOPKOWSKI A, MAJKA M, OSTROWSKI M, RATAJCZAK MZ. Heparinized cadaveric organ donors (HCOD) – a potential source of hematopoietic cells for transplantation and gene therapy. *Transplant* 2001; **71**: 1003–1007.
- [16] MACHALIŃSKI B, MARLICZ M, PACZKOWSKI M, KIJOWSKI J, GONTAREWICZ A, OSTROWSKI M, RATAJCZAK MZ. Heparinized cadaveric organ donors (HCOD) as a potential source of cells for hematopoietic transplants and gene therapy. *Blood* 1999; (suppl.)
- [17] MACHALIŃSKI B. Pozyskiwanie komórek hematopoetycznych do przeszczepień ze szczególnym uwzględnieniem heparynizowanych dawców narządów. *Ann Acad Med Stetin* 1999; Supl. **60**: 1–118.
- [18] MARLICZ W, PACZKOWSKI M, KIJOWSKI J, MACHALINSKI B, GONTAREWICZ A, PACZKOWSKA E, ŻUKOWSKI M, BOHATYREWICZ R, OSTROWSKI M, CZAJKOWSKI Z, RATAJCZAK MZ. Isolation of the hematopoietic stem cells (HSC) from the heparinized cadaveric multiple organ donors (HCOMD). Potential transplantological implications. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2099–2101.
- [19] MUGISHIMA H, TERASAKI P, SUEYOSHI A. Bone marrow from cadaver donors for transplantation. *Blood* 1985; **65**: 392–396.
- [20] ONO K, ALTER BP. Effects of low oxygen tension and antioxidants on human erythropoiesis in vitro. *Exp Hematol* 1995; **23**: 1372–1377.
- [21] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DERIEL K, ABRAHM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1710–1714.
- [22] RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T, KUCZYŃSKI W, RATAJCZAK J. The influence of 4°C storage on proliferative potential of human bone marrow CD34⁺ cells. Transplantological Implications. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; **3**: 109–112.
- [23] RYBKA WB, FONTES PA, RAO AS, WINKELSTEIN A, RICORDI C, BALL ED, STARZL TE. Hematopoietic progenitor cell content of vertebral body marrow used for combined solid organ and bone marrow transplantation. *Transplant* 1995; **59**: 871–874.
- [24] SKOTNICKI AB. Przeszczepianie szpiku kostnego. W: Fizjologia Krwi. PWN 1998; III, p. 48–57.
- [25] SODERDAHL G, TAMMIK C, REMBERGER M, RINGDEN O. Cadaveric bone marrow and spleen cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; **21**: 79–84.
- [26] SODERDAHL G, TAMMIK C, REMBERGER M, SANDBERG J, TUFVESON G, TOLLEMAR J, RINGDEN O. Immune markers and hematopoiesis of cadaveric bone marrow for transplantation. *Transplant Proc* 1997; **29**: 714–715.
- [27] Taussef A, Wuest D, Civarella D, Ayello J, Zalmen AA. Marrow storage technique a clinical comparison of refrigeration versus cryopreservation. *Acta Hematol* 1991; **85**: 173–178.
- [28] Ustawa z dnia 26 października 1995r. O pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów. Dziennik Ustaw 1995, nr 138, poz.682.
- [29] WAŁASZEWSKI J, ROWIŃSKI W. Problemy przeszczepiania narządów w Polsce. *Pol Przegl Chir* 2001; **73**: 226–228.

Adres autora: Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej
Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
e-mail: machalin@sci.pam.szczecin.pl

BADANIA NAD POCHODZENIEM MIOCYTÓW BŁONY WEWNĘTRZNEJ W PRZESZCZEPIE AORTY ALLOGENICZNEJ U SZCZURA*

ORIGIN OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN AORTIC
ALLOGRAFT IN THE RAT

Piotr RELIGA, Krzysztof BOJAKOWSKI, Zbigniew GACIŃG

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Nadciśnienia Tętniczego
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Rozplem błony wewnętrznej stanowi podstawową zmianę w patologicznej przebudowie ściany naczynia. Badania z zastosowaniem modelu przeszczepienia aorty allogenicznej wskazują, że znaczna część miocytów powstałej błony wewnętrznej wywodzi się z komórek macierzystych pochodzących od biorecy. Prowadzone doświadczenia mają na celu określenie mechanizmów kontrolujących migrację prekursorów komórek mięśni gładkich do ściany naczynia.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, mioocyty ściany naczynia, przebudowa ściany naczynia

Summary: Neointima formation is a major lesion of vascular remodeling. Using rat aortic allograft we have shown that circulating progenitors of bone marrow origin give rise to cells with smooth muscle-like properties during formation of neointimal thickenings. We try to elucidate the mechanisms that control accumulation of progenitors of smooth muscle cell in the arterial wall.

Key words: stem cell, vascular smooth muscle cells, vascular remodeling

WPROWADZENIE

Ściana naczynia pod wpływem czynników wzrostowych, hormonów, cytokin oraz bodźców mechanicznych, takich jak: ciśnienie tętnicze i siła ścinająca płynącej krwi, podlega ciągłej przebudowie. Proces ten w warunkach fizjologicznych zapewnia

*Praca finansowana z funduszy KBN (083/P05/2002). Piotr Religa i Krzysztof Bojakowski są laureatami nagrody Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej.

zachowanie odpowiednich właściwości naczynia, a w warunkach patologicznych prowadzi do zaburzenia przepływu krwi przez naczynia. Dochodzi wówczas do stopniowego grubienia ściany naczynia, głównie w obrębie błony wewnętrznej, której głównym składnikiem komórkowym stają się komórki mięśni gładkich (VSMC, *vascular smooth muscle cells*). Komórki mięśni gładkich mogą występować w tętnicach w dwóch różnych fenotypach morfologicznych. Komórki fenotypu kurczliwego są komórkami zróżnicowanymi, niemającymi zdolności do proliferacji, typowymi dla błony środkowej tętnic. W komórkach tych włókna alfa-aktynowe ulegają depolimeryzacji i dezorganizacji, a siateczka wewnątrzplazmatyczna i aparat Golgiego rozrastają się [1]. W trakcie przebudowy ściany naczynia (*vascular remodeling*), VSMC z błony środkowej ulegają pobudzeniu i odróżnicowaniu do fenotypu syntetyzującego, zdolnego do proliferacji i migracji do błony wewnętrznej. Część komórek obecnych w błonie wewnętrznej pochodzi także z błony zewnętrznej – przydanki [2–4].

Badania ostatnich lat potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, że w powstawaniu błony wewnętrznej (neointima) w przebudowie naczynia wywołanej odpowiedzią immunologiczną biorą udział komórki biorcy przeszczepu. We własnych badaniach z zastosowaniem przeszczepionej aorty allogenicznej szczura (dawca F344/Fisher, biorca Lewis) wykazaliśmy, że miocyty pojawiają się w błonie wewnętrznej równocześnie z komórkami zapalnymi [5]. Istnieją trzy potencjalne źródła VSMC w błonie wewnętrznej przeszczepionej aorty:

- migracja z sąsiedniego fragmentu aorty biorcy [6],
- transformacja komórek zapalnych naciekających przeszczep [2],
- krążące we krwi komórki macierzyste pochodzenia szpikowego [7].

Teoria postulująca pochodzenie komórek mięśni gładkich budujących błonę wewnętrzną z komórek macierzystych została sformułowana na podstawie badań przy użyciu myszy transgenicznych [6], a ostatnio wykazano możliwość różnicowania się komórek krążących we krwi ludzkiej do miocytów w warunkach hodowli [8]. Nasze dotychczasowe badania wykazały, że pojawianie się komórek macierzystych/prekursorowych w trakcie przebudowy ściany naczynia jest dynamicznym procesem, zależnym od stopnia uszkodzenia ściany naczynia, szczególnie od stopnia martwicy błony środkowej.

CEL PRACY

Celem projektu jest identyfikacja czynników, które określają udział komórek macierzystych/prekursorowych dla VSMC w trakcie przebudowy ściany naczynia oraz rozrostu błony wewnętrznej. Ponadto pragniemy określić fenotyp komórek prekursorowych mięśni gładkich biorących udział w tym procesie.

MORFOLOGICZNA OCENA ZMIAN W PRZESZCZEPIE AORTY ALLOGENICZNEJ

W projekcie posługujemy się przeszczepieniem aorty allogenicznej szczura (dawca F344/Fischer, biorca Lewis), które uważa się za model przebudowy ściany naczynia indukowanej bodźcem zapalnym. Po transplantacji, w naczyniach allogenicznych widoczne jest stopniowe grubienie błony wewnętrznej, nacieki komórkowe w przydanie oraz fragmentacja i zaburzenie układu włókien elastynowych. Powyższych zmian nie wykrywa się w aortach syngenicznych, które w barwieniu hematoksyliną-cozyną oraz orceiną nie różnią się od naczynia nieprzeszczepionego [9].

Zastosowanie cyfrowej analizy obrazu pozwala na ilościową ocenę zmian struktury ściany naczynia w trakcie procesu przebudowy. Powierzchnia błony wewnętrznej aorty allogenicznej pobranej po 12 tygodniach od przeszczepienia jest kilkanaście razy większa niż powierzchnia aorty nieprzeszczepionej, aorty syngenicznej czy allogenicznej badanych po 1 tygodniu od transplantacji. Od 4 tygodnia po przeszczepieniu powierzchnia błony wewnętrznej, a także stosunek powierzchni błony wewnętrznej do błony środkowej w allogenicznych aortach są istotnie większe niż w aortach nieprzeszczepionych, syngenicznych oraz aortach allogenicznych pobranych po 1 tygodniu od zabiegu (tab. 1).

Po 12 tygodniach od przeszczepienia światło aorty allogenicznej było o 60% większe od światła aorty nieprzeszczepionej i o 55% większe od światła aorty syngenicznej pobranej 10 tygodni po przeszczepieniu. Charakter obserwowanej przebudowy ściany naczyń allogenicznych, zwiększenie grubości ściany naczynia bez zmniejszenia jego światła przypomina wczesne zmiany miażdżycowe obserwowane u człowieka, w których

TABELA 1. Analiza morfometryczna przekroju przeszczepionej aorty – światło naczynia (μm)

Nieprzeszczepione (F344)(n=4)	Syngeniczne(F344→F344)		Allogeniczne (F344→Lewis)		
	1tydz.(n=3)	10 tyg (n=4)	1 tydz. n=5)	2 tyg. (n=5)	8 tyg (n=4)
789±177	617±55	820±95	700±82	859±121§	1259±74 #, §, ‡
119±8	98±6	138±8	137±23	138±22	92±62
0,02±0,02	0,01±0,01	0,03±0,01	0,03±0,02	0,24±0,1	0,39±0,09 #, §, ‡
0,38±0,06	0,25±0,02	0,44±0,09	0,42±0,05	0,63±0,1	0,45±0,13
0,06±0,03	0,04±0,02	0,08±0,03	0,08±0,03	0,37±0,1	0,89±0,16 #, §, ‡

Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD; # $p < 0,05$ w porównaniu do aort nieprzeszczepionych;

§ $p < 0,05$ w porównaniu do aort allogenicznych pobranych w 1 tygodniu po przeszczepieniu;

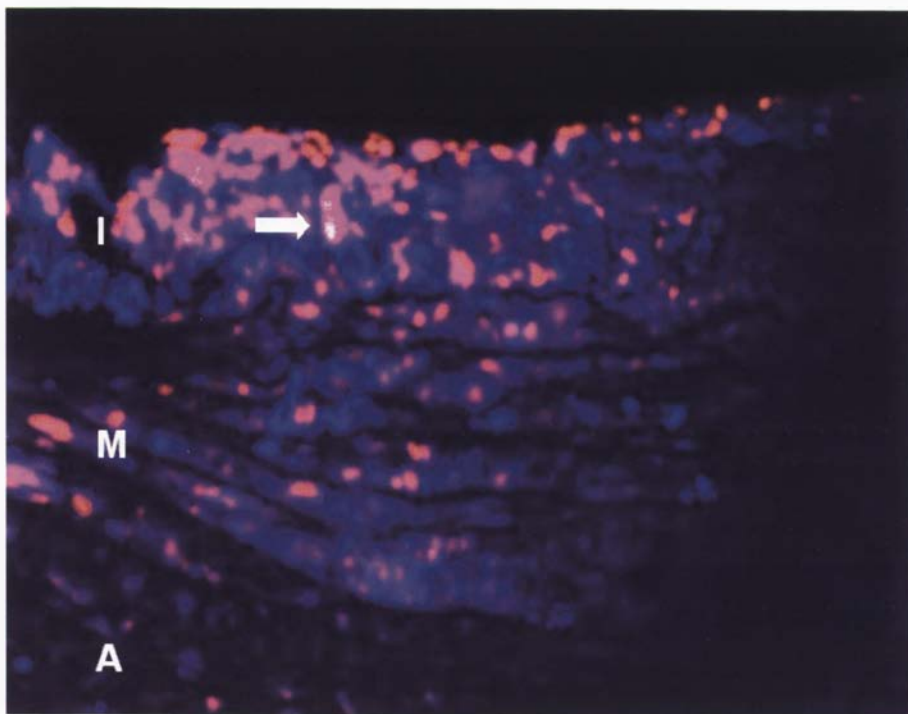
‡ $p < 0,05$ w porównaniu do aort allogenicznych pobranych w 2 tygodniu po przeszczepieniu

widoczny jest kompensacyjny wzrost powierzchni całego naczynia [10]. Tych zmian nie obserwuje się w naczyniach syngenicznych pobranych 10 tygodni po zabiegu.

W badaniach z użyciem mikroskopii elektronowej stwierdziliśmy, że pierwsze zmiany w ścianie naczynia (1 tydzień po przeszczepie) związane są ze złuszczeniem się komórek śródbłonka, adhezją płytek i limfocytów do białek błony podstawnej oraz odróżnicowaniem się w błonie środkowej komórek mięśni gładkich do fenotypu syntetyzującego. Następnie komórki mięśniowe znajdowane były w obrębie błony wewnętrznej. Jednocześnie limfocyty i makrofagi napływały do błony wewnętrznej i zewnętrznej. W późniejszym okresie widoczne było przekształcanie się komórek mięśni gładkich i makrofagów w komórki piankowate. W końcowych etapach obserwowanej przebudowy ściany naczynia (12 tydzień po transplantacji) grubienie błony wewnętrznej ulegało zahamowaniu, malał naciek zapalny, pojawiały się komórki śródbłonka, w błonie środkowej widoczne były nieliczne komórki mięśni gładkich [11].

IDENTYFIKACJA POCHODZENIA VSMC W BŁONIE WEWNĘTRZNEJ PRZESZCZEPU AORTY ALLOGENICZNEJ

Przeszczepienie aorty od samicy (dawca F344♀) do allogenicznego biocy samca (biorca Lewis♂) stwarza możliwość odróżnienia komórek biocy i dawcy na podstawie identyfikacji sekwencji kodowanych w chromosomie Y. Komórki biocy są wykrywane we fragmencie przeszczepionej aorty przy zastosowaniu metod rozpoznających sekwencje swoiste dla genu SRY. Metoda RT PCR (*real-time polymerase chain reaction*) jest wykorzystywana do analizy ilościowej, a PRINS (*primed in-situ labeling i fluorescence in situ hybridisation*) do określenia fenotypu komórek biocy przez połączenie z równoczesnym barwieniem immunohistochemicznym. Analiza ilościowa wskazuje, że rozplem błony wewnętrznej wiąże się z akumulacją komórek pochodzenia biocy, mających gen SRY. Równoczesne barwienie na obecność α -aktyny mięśni gładkich wskazuje, że wśród komórek pochodzących od biocy znajdują się także VSMC (ryc. 1). W badaniach nad rolą komórek pochodzących ze szpiku w tworzeniu błony wewnętrznej wykorzystane zostały zwierzęta chimeryczne. Samicom szczepu Lewis po pełnej supresji własnego szpiku przeszczepiono szpik od samców szczepu Lewis. Po 14 dniach od transplantacji szpiku zwierzętom tym przeszczepiono aortę pobraną od samicy F344. Chromosom Y i gen *SRY* jest w tym układzie znacznikiem komórek pochodzenia szpikowego (ryc. 1), co pozwoliło wykazać, że część VSMC pochodzi z prekursorów szpikowych [12]



RYCINA 1. Połączone barwienie metodą PRINS i immunohistochemiczne 3-tygodniowego przeszczepu aorty od dawcy samicy F344 do biorcy chimery Lewis (samica Lewis ze szpikiem samca Lewis). Gen *SRY* został użyty jako znacznik komórek szpikowych gospodarza (biorcy) a przeciwciała przeciwko α -aktynie mięśni gładkich jako marker miocytów. Komórka wykazująca obecność genu *SRY* o fenotypie miocytów zaznaczono białą strzałką. Jądra zabarwiono czerwienią propidium; I – błona wewnętrzna (intima), M – środkowa (media), A – przydanka (*adventitia*)

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA GROMADZENIE SIĘ PREKURSORÓW VSMC W ŚCIANIE NACZYNNIA

Mechanizm, który odpowiada za gromadzenie się prekursorów VSMC w ścianie naczyń, nie został poznany. W badaniach wstępnych stwierdziliśmy, że podawanie biorcy immunosupresji (cyklosporyna A) istotnie zmniejsza liczbę komórek biorcy w błonie wewnętrznej allogenicznego przeszczepu aorty [13]. Dowodzi to wpływu odpowiedzi immunologicznej na migrację prekursorów VSMC i dalsze badania mają na celu identyfikację czynnika (mediatora) warunkującego gromadzenie się prekursorów w ścianie naczyń. Kolejnym celem jest próba scharakteryzowania VSMC pochodzących z krążących prekursorów. W tym celu komórki są izolowane z błony wewnętrznej aort przeszczepionych chimerom szpikowym (samica ze szpikiem samca), a następnie klonowane *in vitro* z wykorzystaniem podłoża selektywnych dla mięśni gładkich, śródbłonna oraz ich prekursorów. Planowane jest badanie porównawcze

komórek mięśniowych pochodzących z błony wewnętrznej, środkowej oraz ze szpiku przy zastosowaniu oceny morfologicznej (mikroskopia świetlna, elektronowa), ekspresji genów (*micro RNA assay*, RT PCR), analizy markerów antygenowych (immunohistochemia).

LITERATURA

- [1] THYBERG J, BLOMGREN K, HEDIN U, DRYJSKI M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995; **281**: 421–433.
- [2] BIRUKOV K, FRID M, ROGERS J, SHIRINSKY V, KOTELIANSKY V, CAMPBELL J, CAMPBELL G. Synthesis and expression of smooth muscle phenotype markers in primary culture of rabbit aortic smooth muscle cells: influence of seeding density and media and relation to cell contractility. *Exp Cell Res* 1993; **204**: 46–53.
- [3] THYBERG J, BLOMGREN K, ROY J, TRAN P, HEDIN U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 837–846.
- [4] LI G, CHEN S-J, OPARIL S, CHEN Y-F, THOMPSON J. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* 2000; **101**: 1362–1365.
- [5] BOJAKOWSKI K, RELIGA P, BOJAKOWSKA M, HEDIN U, GACIONG Z, THYBERG J. Atherosclerosis in rat aortic allografts, early changes in endothelial integrity and smooth muscle phenotype. *Transplantation* 2000; **70**: 65–72.
- [6] HILLEBRANDS J, KLATTER F, VAN DEN HURK B, POPA E, NIEUWENHUIS P, ROZING J. Origin of neointimal endothelium and alfa-actin positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1411–1422.
- [7] SHIMIZU K, SUGIYAMA S, AIKAWA M, FUKUMOTO Y, RABKIN E, LIBBY P, MITCHELL R. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med* 2001; **7**: 738–741.
- [8] SIMPER D, STALBOERGER PG, PANETTA CJ, WANG S, CAPLICE NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002; **106**: 1199–1204.
- [9] GACIONG Z, PACZEK L, BOJAKOWSKI K, SOCHA K, WISNIEWSKI M, HEIDLAND A. Beneficial effect of proteases on allograft arteriosclerosis in a rat aortic model. *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**: 987–989.
- [10] GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS C, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS G: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; **316**: 1371–1374.
- [11] RELIGA P, BOJAKOWSKI K, GACIONG Z, THYBERG J, HEDIN U. Arteriosclerosis in rat aortic allografts: Dynamics of cell growth, apoptosis and expression of extracellular matrix proteins. *Mol Biol Biochem* 2003; **249**: 75–83.
- [12] RELIGA P, BOJAKOWSKI K, MAKSYMOWICZ M, BOJAKOWSKA M, SIRSIJO A, GACIONG Z, OLSZEWSKI W, HEDIN U, THYBERG J. Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries *Transplantation* 2002; **74**: 1310–1315
- [13] ESOT Meeting 2003, Venice.

Adres autora: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a
e-mail: zgaciong@amwaw.edu.pl

OPTIMALIZACJA METOD IZOLACJI I EKSPANSJI KOMÓREK CD 34⁺ KRWI PĘPOWINOWEJ

OPTIMALIZATION OF THE METHODS OF CD 34⁺ CORD BLOOD CELLS ISOLATION AND EXPANSION

Małgorzata STEC¹, Danuta JAROCHA¹, Marek ZEMBALA²

¹Zakład Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

²Zakład Immunologii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie: Celem pracy była optymalizacja ekspansji komórek linii monocytowo-makrofagowej na potencjalne potrzeby eksperymentalne i terapeutyczne. Porównano różne frakcje komórek poddawanych ekspansji (mniej lub bardziej wzbogacone w komórki CD34⁺), optymalny skład czynników wzrostowych i cytokin oraz surowicę wchodzącą w skład medium hodowlanego.

Słowa kluczowe: ekspansja *ex vivo*, komórki CD34⁺, krew pępowinowa, monocyty

Summary: The aim of our study was an optimization of *ex vivo* expansion of human monocytes and macrophages for potential clinical application. To establish the most efficient expansion protocol we have compared various cell fractions of human cord blood mononuclear cells (more or less enriched in CD34⁺ cells), different combinations of growth factors and cytokines as well as medium components.

Key words: *ex vivo* expansion, CD34⁺ cells, cord blood, monocytes

Wykaz skrótów: **CML** (*Chronic Myelogenous Leukemia*) – przewlekła białaczka szpikowa; **SCF** (*Stem Cell Factor*) – czynnik wzrostu hematopoetycznych komórek macierzystych; **IL-1** (*interleukin 1*) – interleukina 1; **IL-3** (*interleukin 3*) – interleukina 3; **IL-6** (*interleukin 6*) – interleukina 6; **IL-11** (*interleukin 11*) – interleukina 11; **EPO** (*Erythropoietin*) – erytropoetyna; **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii granulocytowo-makrofagowych; **IMDM** (*Iscove Modified Dulbecco's Medium*) – podłoże hodowlane; **TPO** (*Trombopoietin*) – trombopoetyna; **G-CSF** (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii granulocytarnych; **MDGF** (*Megakaryocyte Development and Growth Factor*) – czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii megakariocytarnych; **CFU-GM**

*Praca naukowa finansowana przez grant KBN PBZ-KBN-083/P05/2002 i grant CMUJ 501/p/189/L

(*Colony Forming Unit*) – komórka tworząca w hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; **BFU-E** (*Burst Forming Unit*) – komórka tworząca w hodowli kolonie erytroidalne; **CFU-GEMM** (*Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte*) – komórka tworząca w hodowli duże kolonie złożone z wszystkich rodzajów komórek krwiotwórczych; **M-CSF** (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostu stymulujący tworzenie *in vitro* kolonii makrofagowych; **FBS** (*Fetal Bovine Serum*) – surowica bydlęca; **HS** (*Horse Serum*) – surowica końska; **SF** (*Serum Free*) – surowica syntetyczna

EKSPANSJA KOMÓREK UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO W HODOWLACH *IN VITRO*

Ekspansja w hodowlach *ex vivo* pozwala namnożyć komórki układu krwiotwórczego do celów eksperymentalnych i leczniczych. Ekspansji można poddawać krwiotwórcze komórki macierzyste, progenitorowe oraz liniowo zróżnicowane (mieloblasty, erytroblasty i megakarioblasty). Pierwszym układem doświadczalnym, w którym stała się możliwa dłuższa hodowla krwiotwórczych komórek macierzystych, były komory dyfuzyjne (Breivik 1971). W 1973 roku Dexter i wsp. opracowali hodowle komórek szpiku na komórkach fibroblastoidalnych pozyskiwanych z podścieliska szpiku kostnego. Była to jedna z najwcześniejszych prób zwiększania w hodowli liczby komórek progenitorowych, którą dzisiaj nazwalibyśmy ekspansją [30]. Kilka lat później Iscove i wsp. uzyskali 8–12-krotny wzrost liczby mysich komórek macierzystych podczas 4-dniowej hodowli [11]. W kolejnych doniesieniach autorzy wykazywali, że w określonych warunkach hodowli możliwa jest ekspansja krwiotwórczych komórek progenitorowych [3,20,21,30].

Stosunkowo łatwo udaje się namnażać *ex vivo* w hodowlach komórki układu krwiotwórczego, które są zróżnicowane liniowo (megakarioblasty, mieloblasty i erytroblasty). Ukazały się doniesienia opisujące namnażanie w hodowlach *ex vivo* komórek układu megakariocytarnego i erytroidalnego [22,23,24,32]. Są to metody pozwalające na uzyskiwanie tych komórek w hodowlach *in vitro* w ilościach pozwalających na wykorzystanie ich do celów klinicznych [8,16,25] i doświadczalnych [14,25]. Poddane ekspansji progenitory układu megakariocytowego mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu małopłytkowości, a namnożone progenitory układu czerwonekrwinkowego mogą zostać wykorzystane w leczeniu niedokrwistości. Pozyskanie czystych populacji tych komórek umożliwi poza tym zastosowanie ich jako modeli doświadczalnych w badaniach nad krwiotworzeniem. W komórkach tych można badać ekspresję genów zarówno na poziomie mRNA, jak i białek, jak też wykorzystywać je w różnych esejach biologicznych. Dane doświadczalne uzyskane w takich modelach są znacznie cenniejsze od wyników uzyskanych z badań, w których jako modele komórek układu krwiotwórczego wykorzystuje się ustalone transformowane nowotworowo hematopoetyczne linie komórkowe.

Metody ekspansji komórek krwiotwórczych w hodowlach *ex vivo* są ciągle udoskonalane. Trwają prace nad udoskonalaniem zarówno samych warunków hodowli (skład medium hodowlanego), jak i wykorzystania odpowiednich czynników

stymulujących proliferację/przeżywalność komórek (czynniki wzrostowe cytokiny, chemokiny, hormony etc.) [5,12,19,20,21,26,28].

KLINICZNE PRÓBY WYKORZYSTANIA KOMÓREK POZYSKIWANYCH Z EKSPANSJI

Pierwsze próby przeszczepiania komórek poddawanych ekspansji *ex vivo* prowadzono na myszach. Po udanych eksperymentach na zwierzętach w 1983 r. Dexter podał 2 pacjentom szpik kostny hodowany *ex vivo* [3]. Podobne badania przeprowadził Barnett i jego zespół na pacjentach z CML. Próby te pokazały, że jest możliwe podanie pacjentom komórek poddawanych hodowli poza jego ustrojem bez ryzyka pojawienia się efektów ubocznych. Niestety nie udało się jednak przyspieszyć odbudowy hematologicznej u powyższych pacjentów [3].

W kolejnych latach pojawiały się następne próby. Zespół Naparstka zaaplikował pacjentom z chorobami hematologicznym poddawanym allogenicznym przeszczepom krwiotwórczym komórki szpiku poddane ekspansji *ex vivo*. Pacjenci powyżsi otrzymali 2/3 szpiku niepoddanego ekspansji razem z 1/3 pobranych komórek, które uzyskano z 4-dniowej ekspansji za pomocą GM-CSF i IL-3. Nie zauważono jednak korzystnego wpływu na szybkości rekonstrukcji układu krwiotwórczego po przeszczepie [2]. Podobne badania przeprowadził Brugger i wsp. Przeszczepił on 10 pacjentom autologiczne komórki pochodzące z mobilizowanej krwi obwodowej, które poddano 12-dniowej ekspansji *ex vivo* w obecności odpowiedniego koktajlu czynników wzrostowych (SCF + IL-1 + IL-3 + IL-6 + EPO). W wspomnianych badaniach sześciu chorych otrzymało wyłącznie komórki uzyskane z ekspansji, a czterem pacjentom podano komórki te łącznie z komórkami niepoddanymi ekspansji. Chociaż pacjenci uzyskali szybko odbudowę hematologiczną, to jednak nie zauważono różnic w kinetyce odbudowy w odniesieniu do historycznych kontroli [2,3].

Uzyskiwane początkowo wyniki negatywne nie zniechęciły jednak dalszych badaczy. Zgodnie z powyższym Mc Niece i wsp. poddali 10-dniowej ekspansji komórki CD34⁺ pozyskane z mobilizowanej krwi obwodowej w IMDM z dodatkiem SCF, TPO i G-CSF. Pacjentom zaaplikowano komórki poddane ekspansji łącznie z komórkami CD34⁺. Odbudowa neutrofilii była 3–4 dni wcześniejsza, lecz nie zauważono wpływu na odbudowę płytek [2]. Paquette i wsp. opisali z kolei przeszczep autologicznych komórek krwi obwodowej u pacjentów z rakiem piersi, które przeszczepiano łącznie z komórkami poddawanymi 9-dniowej ekspansji w obecności: G-CSF, SCF i MDGF. Zauważono znaczące skrócenie zarówno czasu neutropenii, jak i małopłytkowości [3].

Reiffers i wsp. opisali z kolei wyniki podobnych przeszczepów autologicznych komórek krwi obwodowej u pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Zaobserwowano skrócenie czasu neutropenii <500/ μ l do 2 dni [2].

ŹRÓDŁA KOMÓREK PODDAWANYCH EKSPANSJI

Do niedawna jedynie szpik kostny oraz mobilizowana krew obwodowa były powszechnie używane jako podstawowe źródła komórek do ekspansji oraz celów przeszczepowych [3].

Od czasu, kiedy wykryto w krwi pępowinowej obecność licznych komórek macierzystych i ukierunkowanych krwiotworzenia, wzrosło również zainteresowanie potencjalnym wykorzystaniem komórek pozyskiwanych z krwi pępowinowej do przeszczepów [1]. Po raz pierwszy użyto krwi pępowinowej jako materiału przeszczepowego w 1990 roku u dziecka z anemią Fanconiego.

Krew pępowinowa noworodka pod niektórymi względami bardziej przypomina szpik kostny niż niemobilizowaną krew obwodową osób dorosłych. Odsetek komórek mających na swej powierzchni antygen CD34, który jest uważany za marker charakterystyczny dla wczesnych komórek krwiotwórczych, wynosi 0,02–1,43% [9]. Wartość ta jest bardziej zbliżona do odsetka komórek CD34⁺, jaki występuje w szpiku kostnym dorosłych (0,5–5%) niż w ich niemobilizowanej krwi obwodowej (<0,01%) [4, 31].

Cechą wyróżniającą komórki krwi pępowinowej jest także ich znacznie wyższy potencjał proliferacyjny i zdolność do tworzenia większej liczby kolonii w hodowlach *in vitro* w porównaniu z komórkami macierzystymi szpiku dorosłego człowieka [9, 13, 15].

Krew ta jest łatwo dostępna, poprzez stosunkowo prostą aspirację z naczyń pępowinowych i łożyska po porodzie. Pozyskanie krwi pępowinowej nie stanowi żadnego zagrożenia życia czy zdrowia zarówno matki, jak i noworodka.

Największą jednak niedogodnością i ograniczeniem szerszego wykorzystywania krwi pępowinowej w transplantologii jest stosunkowo niewielka objętość pozyskiwanych porcji tej krwi [10]. Stąd też ekspansja wczesnych komórek krwi pępowinowej stanowi realną szansę na zwiększenie liczby komórek, które mogą być potencjalnie wykorzystane podczas przeszczepów.

Stwierdzono, że stymulacja komórek macierzystych krwi pępowinowej przez czynniki wzrostowe promująca megakariopoezę daje w układzie *in vitro* efekty znacząco lepsze niż w przypadku komórek krwi obwodowej lub szpiku kostnego [32]. Ta sama grupa pokazała, że ta sama kombinacja cytokin może różnie działać w zależności od źródła komórek poddawanych ekspansji. Komórki CD34⁺ pochodzące z krwi obwodowej oraz ze szpiku kostnego odpowiadały lepiej na stymulację cytokinami TPO i IL-1, wzrostem liczby dojrzałych i niedojrzałych megakariocytów, niż komórki krwi pępowinowej. Kombinacja TPO+IL-3 w przypadku komórek CD34⁺ pochodzących z krwi pępowinowej dawała natomiast lepszy wzrost liczby megakariocytów niż w przypadku komórek CD34⁺ izolowanych z krwi obwodowej i szpiku kostnego [32].

W dostępnej literaturze brak jest natomiast szerszych opracowań zajmujących się ekspansją komórek linii monocytowo-makrofagowej.

OPTIMALIZACJA EKSPANSJI KOMÓREK LINII MONOCYTOWO-MAKROFAGOWEJ

Zespół nasz podjął się optymalizacji ekspansji *ex vivo* komórek linii monocytowo-makrofagowej. W przeprowadzonych badaniach porównaliśmy różne frakcje komórek poddawane ekspansji (komórki jednojądrowe, komórki wzbogacone we frakcję CD34⁺), różne metody izolacji komórek CD34⁺ używanych do ekspansji *ex vivo* (izolacja immunomagnetyczna, wykorzystanie sortera komórkowego), oraz skład pożywki (surowica, kombinacja czynników wzrostowych). Jako model doświadczalny przyjęliśmy krew pępowinową.

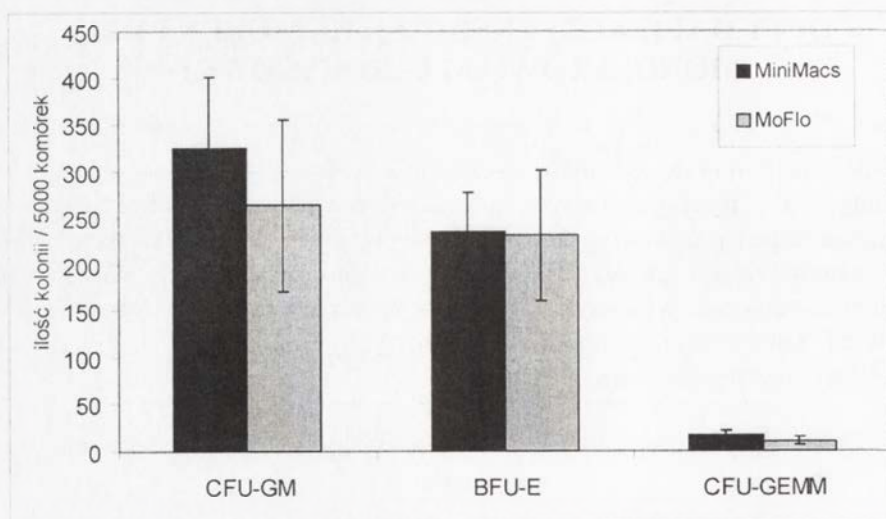
Ocena optymalnej frakcji komórek krwi pępowinowej używanych do ekspansji

Uważa się, że obecność w hodowli bardziej dojrzałych komórek CD34⁻ i/lub czynników, które one wydzielają, może powodować ujemny wpływ na ekspansję komórek progenitorowych/macierzystych [3]. W wykonanych badaniach porównaliśmy najpierw efektywność ekspansji komórek jednojądrowych krwi pępowinowej lub frakcji komórek krwi pępowinowej wzbogaconych w komórki CD34. Stwierdziliśmy, że komórki krwi pępowinowej wzbogacone w antygen CD34⁺ poddają się znacznie lepiej ekspansji. Zgodnie z powyższym liczba komórek uzyskiwanych z ekspansji komórek CD34⁺ była 7–10 razy wyższa niż w przypadku poddawanych ekspansji komórek jednojądrowych. Dlatego też w dalszych badaniach do ekspansji *ex vivo* używaliśmy frakcję komórek CD34⁺.

Ocena optymalnej metody izolacji komórek CD34⁺ krwi pępowinowej używanych do ekspansji

Odkrycie antygenu CD34 było przełomowym momentem w rozwoju metod izolacji wczesnych komórek hematopoetycznych. Wykorzystanie bowiem technik separacji z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD34 umożliwiło oddzielenie wczesnych komórek hematopoetycznych od komórek bardziej dojrzałych. Przeciwciała anti-CD34 mogą być koniugowane z kuleczkami paramagnetycznymi (Dynabeads, MiniMAcs), biotyną (Cell Pro) lub z fluorochromami. Następnie wyznakowane komórki są izolowane w polu magnetycznym (MiniMacs, Dynabeads) lub z zastosowaniem kolumn avidynowych (Cell Pro). Komórki znakowane fluorochromem są sortowane za pomocą cytometru przepływowego [18,29,31].

W przeprowadzonych badaniach porównaliśmy dwa sposoby izolacji komórek CD34⁺ (z użyciem sortera komórkowego MoFlo oraz z zastosowaniem przeciwciał połączonych z kuleczkami magnetycznymi z wykorzystaniem kolumn separacyjnych firmy MiltenyiBiotec). W obu przypadkach izolacji uzyskaliśmy komórki o czystości >90% i żywotności >95%. Zakładając następnie kolonie w mediach półpłynnych okazało się, że komórki uzyskane w wyniku izolacji na kolumnach dają większą liczbę kolonii w porównaniu z komórkami uzyskanymi w wyniku sortowania z zastosowaniem cytometru



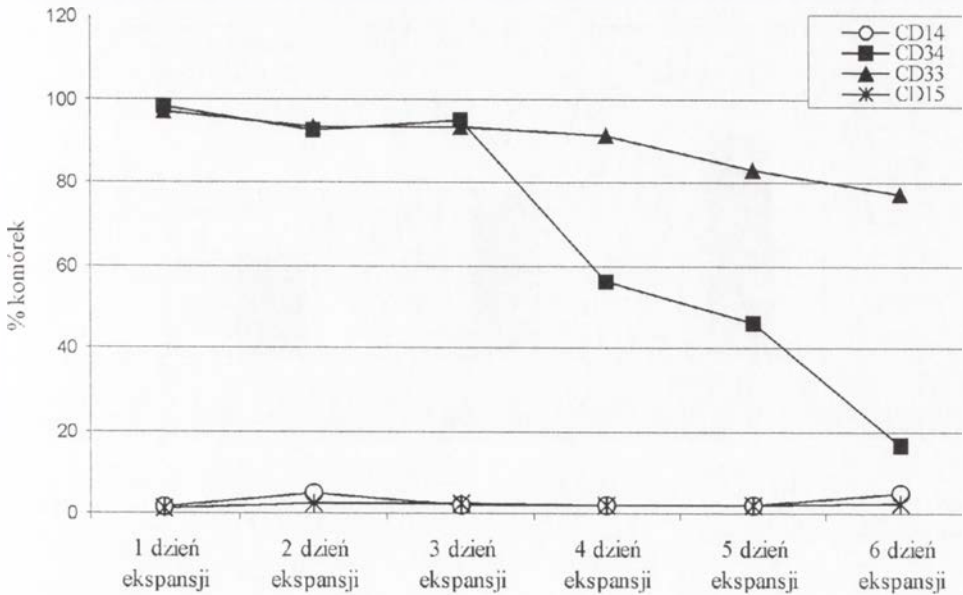
RYCINA 1. Porównanie dwóch sposobów izolacji komórek CD34⁺ (za pomocą kolumn magnetycznych firmy MiniMacs oraz sortera komórkowego MoFlo). Ekspansję oceniano za pomocą klonogenności uzyskanych komórek na podstawie tworzenia kolonii przez komórki progenitorowe (CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM)

przeływowego (ryc.1). Za pomocą powyższej metody uzyskaliśmy również największą liczbę komórek CD34⁺.

Ponieważ liczba uzyskiwanych z krwi pępowinowej komórek CD34⁺ jest niewielka, postanowiliśmy opracować metodę umożliwiającą wzrost liczby tych komórek w hodowlach *in vitro*. W tabeli 1 przedstawiamy fenotyp komórek po izolacji oraz po 3 dniach ekspansji w medium X-VIVO 10 (Bio Whittaker, Belgium) z dodatkiem SCF + FLT-3 + IL-3 + TPO. Po 3 dniach ekspansji uzyskiwaliśmy 10–20-krotny wzrost liczby komórek CD34⁺. W następnych dniach hodowli odsetek tych komórek w prowadzonych hodowlach ulegał stopniowemu zmniejszeniu (ryc. 2).

Optimalny skład pożywki służącej do ekspansji komórek linii monocytowo-makrofagowej

Kluczowym składnikiem medium, w którym poddawane są komórki, jest surowca będąca m.in. źródłem lipidów, peptydów i białek. W przypadku ekspansji komórek linii megakariocytowej i erytroidalnej wykazano m.in., że optymalny wzrost tych komórek uzyskuje się w medium wzbogaconym w tzw. surowicę syntetyczną będącą mieszaniną albuminy, liposomów i transferyny wysyczonej żelazem [22,23]. W wykonanych badaniach porównaliśmy wpływ surowicy bydlęcej, końskiej i tzw. surowicy syntetycznej na ekspansję komórek linii monocytowo-makrofagowej. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do uprzednio uzyskanych wyników badań nad ekspansją komórek linii erytroidalnej i megakariocytowej, najbardziej optymalną ekspansję komórek monocytowych zapewniały surowice zwierzęce (ryc. 3).



RYCINA 2. Ekspresja wybranych markerów powierzchniowych w kolejnych dniach ekspansji komórek CD34+ w medium X-VIVO10, z dodatkiem cytokin SCF + IL-3 + FLT3 + TPO. Oceniano odsetek komórek mających ekspresję CD14,CD33,CD34,CD15

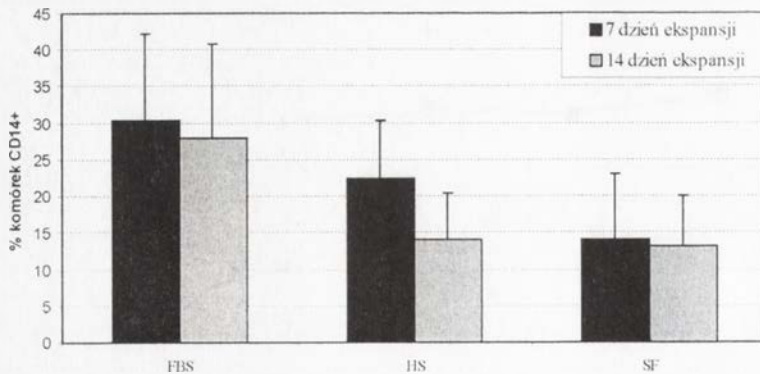
TABELA 1. Porównanie ekspresji wybranych markerów powierzchniowych na komórkach CD34+ po izolacji oraz w 3 dniu ekspansji.

	Komórki po izolacji	3 dzień ekspansji
CD34	91,38 ($\pm 5,8$)	90,5 ($\pm 5,7$)
CD33	65,4 ($\pm 13,76$)	90,25 ($\pm 8,8$)
HLA-DR	86,78 ($\pm 8,45$)	94,75 ($\pm 3,3$)
CD15	1,18 ($\pm 0,9$)	2,6 ($\pm 1,0$)
CD13	85,4 ($\pm 6,5$)	71,5 ($\pm 24,75$)

Optymalny skład cytokin dla ekspansji komórek linii monocytowo-makrofagowej

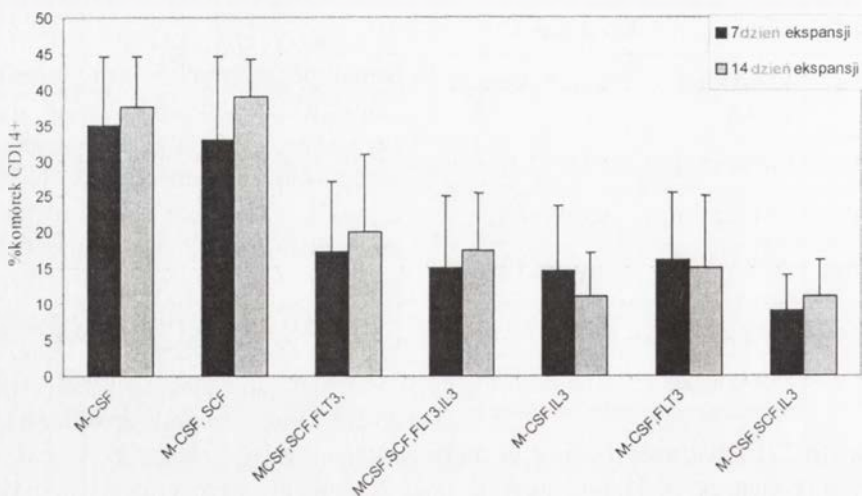
Proliferacja wczesnych komórek hematopoetycznych w szpiku kostnym kontrolowana jest przez szereg cytokin i czynników wzrostowych wydzielanych przez komórki podścieliska. Niektóre czynniki wzrostowe i cytokiny, jak np. SCF, FLT-3, TPO, IL-11, IL-3, IL-6, odpowiedzialne są za proliferację komórek [2,33], podczas gdy inne, jak np. M-CSF, G-CSF, GM-CSF, EPO oraz TPO, powodują głównie różnicowanie i dojrzewanie komórek zróżnicowanych

liniowo [6,27]. Uważa się również, że niektóre witaminy, jak i ich pochodne mają duży wpływ na hematopoezę i mogą współdziałać z czynnikami wzrostowymi [2]. Ukazały się np. doniesienia przedstawiające rolę pochodnej witaminy D3 w ekspansji i dojrzewaniu monocytów i makrofagów [7]. Witamina D3 ma wpływać na ukierunkowanie się komórek CD34+ w kierunku linii monocytarnej [7].

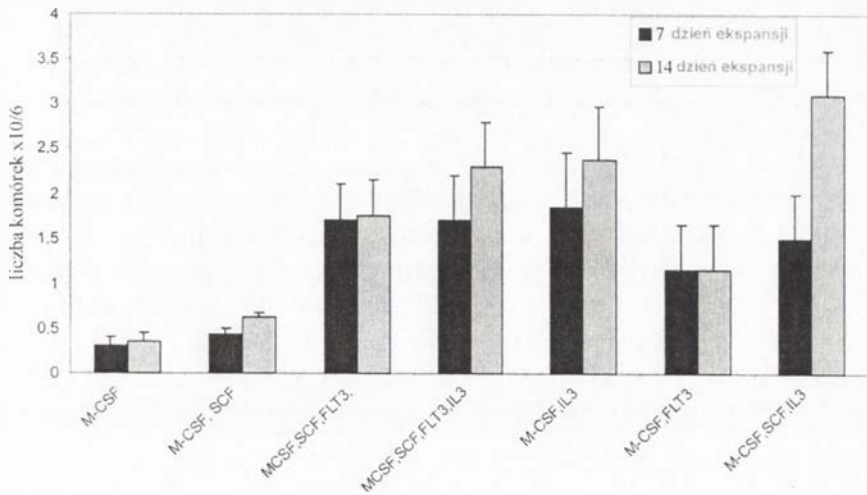


RYCINA 3. Wpływ zastosowanej surowicy (FBS, HS, SF) na ekspansję komórek w kierunku linii monocytowo-makrofagowej

Z dostępnej literatury wiadomo, że różne grupy badaczy stosowały różne kombinacje czynników wzrostowych w celu ekspansji komórek linii mieloidalnej. Haylock i wsp. stwierdzili np., że kombinacja cytokin SCF + IL-1 + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF daje najlepsze efekty (20–60-krotny wzrost liczby CFU-GM w 14-dniowych hodowlach). Brak jednego z tych 6 czynników wpływa niekorzystnie na wyniki ekspansji [3,10].

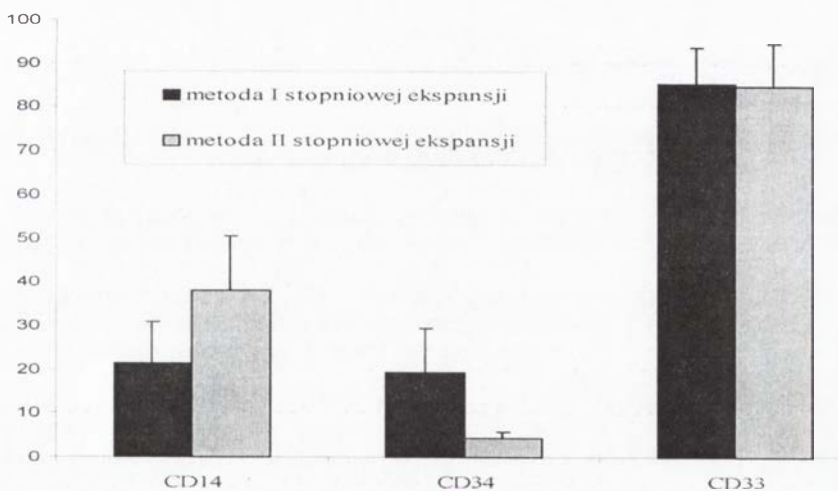


RYCINA 4. Porównanie procentowej zawartości komórek CD14⁺ uzyskanych w 7 i 14 dniu ekspansji w zależności od kombinacji czynników dodawanych do środowiska hodowlanego



RYCINA 5. Porównanie liczby komórek CD14⁺ uzyskanych w 7 i 14 dniu ekspansji w zależności od kombinacji czynników dodawanych do środowiska hodowlanego

Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że zastosowanie M-CSF lub M-CSF+SCF daje wysoką ekspansję komórek posiadających antygen CD14 (ryc. 4), lecz ogólna ich liczba jest jednak niewielka (ryc. 5). Dodatek FLT3 lub IL-3 do M-CSF lub M-CSF+IL-3 zwiększa natomiast całkowitą liczbę komórek CD14 zmniejszając tylko nieznacznie ich odsetek (ryc. 4,5). Z przeprowadzonych badań



RYCINA 6. Porównanie ekspansji komórek CD34⁺ w kierunku linii monocytowo-makrofagowej w metodzie I i II stopniowej ekspansji

wynika więc, że do ekspansji komórek CD34+ w kierunku monocytów najbardziej optymalne wydaje się zastosowanie następujących czynników wzrostowych: M-CSF + SCF + IL3 + FLT3. Z uzyskanych komórek można następnie próbować pozyskać za pomocą kolumn magnetycznych lub sortera komórkowego czystą już frakcję komórek wzbogaconych w antygen CD14.

Uważa się, że istotną rolę w ekspansji odgrywa nie tylko rodzaj czynników, lecz także ich stężenie oraz sekwencja podania [25]. Stwierdziliśmy, że zastosowanie w pierwszych 3 dniach ekspansji wczesnych cytokin takich jak np. SCF + IL-3 + FLT3 + TPO oraz medium zawierającego 4% surowicy bydlęcej, a następnie przeniesienie komórek poddanych wstępnej ekspansji do medium IMDM wzbogaconego surowicą 20% oraz koktajlem następujących cytokin M-CSF + FLT-3 + IL-3 + SCF, pozwalało na zwiększenie efektywności ekspansji komórek CD 14 (ryc.6).

Obecnie pracujemy nad udoskonaleniem tej dwustopniowej strategii ekspansji.

PLANOWANE DALSZE BADANIA

Dalszym celem naszych badań będzie określenie warunków ekspansji, które pozwalałyby na uzyskanie optymalnej liczby komórek linii monocytowo-makrofagowej przy jednoczesnym zachowaniu w hodowanej *ex vivo* mieszaninie komórek – liczby komórek progenitorowych tej linii. Planujemy również ocenę czynnościową uzyskanych komórek w odpowiednich testach *in vitro*. Pozyskane z ekspansji komórki zostaną również poddane próbom modyfikacji genetycznych.

LITERATURA

- [1] BROXMEYER HE. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3828–3832.
- [2] DEVINE SM, LAZARUS HM, EMERSON SG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant* 2003; **31**: 241–252.
- [3] EMERSON S. *Ex Vivo* Expansion of Hematopoietic Precursors, Progenitors, and Stem Cells: The Next Generation of Cellular Therapeutics. *Blood* 1996; **87**, 8: 3082–3088.
- [4] ENGEL H, KAYA E, BALD R, KOLHAGEN H, GRECU O, SCHONDORF T, BRENNE U, KURBACHER CM, GOHRING UJ, KLEINE M, MALLMANN P. Fetal Cord Blood as an Alternative Source of Haematopoietic Progenitor Cells: Immunophenotype, Maternal Cell Contamination, end *Ex Vivo* Expansion. *J Hematother* 1999; **8**: 141–155.
- [5] EUN-SEON YOO, KYUNG-HA RYU, HAE-YOUNG PARK, CHU-MYUNG SEONG, WHA-SOON CHUNG, SEUNG-CHEOL KIM, YONG-MOOK CHOI, MYONG-JOON HAHN, SO-YOUN WOO, JU-YOUNG SEOH. Myeloid differentiation of human cord blood CD34⁺ cells during *ex vivo* expansion using thrombopoietin, flt3-ligand and/or granulocyte-colony stimulating factor. *Br J Haematol* 1999; **105**: 1034–1040.
- [6] GEISSLER K, WAGNER T. Cytokine combination for *in vivo* and *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells. *Acta Med Austriaca* 2000; **27** suppl.52: 21–24.

- [7] GRANDE A, MONTANARI M, TAGLIAFICO E, MANFREDINI R, MARANI ZT, SIENA M., TENEDINI E, GALLINELLI A, FERRARI S. Physiological levels of 1- α , 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34⁺ hematopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 64–651.
- [8] HALLE P, ROUZIER C, KANOLD J, BOIRET N, RAPATEL C, MAREYNAT G, TCHIRKOV A, BERGER M, TRAVADE P, BONHOMME J, DEMEOCQ F. *Ex vivo* expansion of CD34⁺/CD41⁺ late progenitors from enriched peripheral blood CD34⁺ cells. *Ann Hematol* 2000; **79**(1): 13–19.
- [9] HAO Q-L, SHAH AJ, THIEMANN FT, SMOGORZEWSKA EM, CROOKS GM. A functional comparison of CD34⁺CD38⁺ cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 1995; **86**: 3745–3753.
- [10] HAYLOCK DN, TO LB, DOWSE TL, JUTTNER CA, SIMMONS PJ. *Ex vivo* expansion and maturation of peripheral blood CD34⁺ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992; **80**: 1405–1412.
- [11] ISCOVE NN, SCHAW AR, KELLER G. Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension cultures in response to IL-1 and IL-3. *J Immunol* 1989; **80**: 2332–2337.
- [12] KOGLER G, CALLEJAS J, SORG RV, FISCHER J, MIGLIACCIO AR, WERNET P. The effect of different throwing methods, growth factor combinations and media on the *ex vivo* expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1998; **21**(3): 233–241.
- [13] KOPEC-SZLEZAK J, PODSTAWKA U. Komórki hematopoetyczne CD34⁺ krwi pępowinowej. *Acta Hematol* 200; **32**: 61–69.
- [14] LEE B, RATAJCZAK J, DOMS RW, GEWIRTZ AM, RATAJCZAK MZ. Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: Biological implications for HIV-1 infection. *Blood* 1999; **93**: 1145–1156.
- [15] MACHAJ EK, GAJKOWSKA A, JASTRZEWSKA M, OLDAK T, KRUSZEWSKI M, POJDA Z. Short term stimulation of megakaryopoiesis in cord blood derived hematopoietic stem cells in *ex vivo* model. *Pol Arch Med Wewn* 2002; **4**(10): 959–964.
- [16] MAJKA M, BAJ M, KIJOWSKI J, RECA R, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. *In vitro* expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function. *Platelets* 2001; **12**(6): 325–332.
- [17] OUDENRIJN S, BORNE AE, HAAS M. Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34⁺ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Exp Hematol.*, 2000; **28**(9): 1054–1061.
- [18] PAFUMI C, BOSCO P, CAVALLARO A, FARINA M, LEONARDI I., PERNICONE G, BANDIERA S., RUSSO A, GIARDINA P, CHIARENZA M, CALOREGO AE. Two CD34⁺ stem cells from umbilical cord blood enrichment methods. *Pediatr Hematol Oncol* 2002; **19**: 239–245.
- [19] PIACIBELLO W, GAMMAITONI L, BRUNO S, GUNETTI, FAGIOLI, CAVALLONI G, AGLIETTA M. Negative influence of IL-3 on the expression of human cord blood *in vivo* long-term repopulating stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; **9**(6): 945–956.
- [20] QIU L, MEAGHER R, WELHAUSEN S, HEYE M, BROWN R, HERZIG RH. *Ex vivo* expansion of CD34⁺ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. *Hematother Stem Cell Res* 1999; **8**(6): 609–618.
- [21] QUREOL S, CAPMANY G, CANCELAS JA, GARCIA J. Expansion of cord blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; **21**, suppl.3: 77–80.
- [22] RATAJCZAK J, MACHALINSKI B, SAMUEL A, PERTUSINI E., MAJKA M., CZAJKA R, RATAJCZAK MZ. A novel serum free system for cloning human megakaryocytic progenitors (CFU-Meg): The role of thrombopoietin and other cytokines on bone marrow and cord blood CFU-Meg growth under serum free conditions. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 55–60.
- [23] RATAJCZAK J, MARLICZ W, MACHALINSKI B, PERTUSINI E, CZAJKA R, RATAJCZAK MZ. An improved serum free system for cloning human „pure” erythroid colonies. The role of the different growth factors and cytokines on BFU-E formation by the bone marrow and cord blood CD34⁺ cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 61–66.
- [24] RATAJCZAK J, ZHANG Q, WOJCZYK S, PERTUSINI E, WASIK M, RATAJCZAK MZ.: The role of insulin, and insulin like growth factor-I in regulating human erythropoiesis. Studies *in vitro* under serum free conditions – comparison to other cytokines and growth factors. *Leukemia* 1998; **12**: 371–381.
- [25] RATAJCZAK MZ, RATAJCZAK J, MACHALINSKI B, MICK R, GEWIRTZ AM. *In vitro* and *in vivo* evidence that *ex vivo* cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate post-transplant thrombocytopenia. *Blood* 1998; **91**: 353–359.

- [26] SAELANDS, CAUX C, FAVRE C, DUVERT V, PEBUSQUE MJ, MANNONI P, de VRIES JE. Combined and sequential effects of human IL-3 and GM-CSF on proliferation of CD34⁺ hematopoietic cells from cord blood. *Blood* 1989; **73**(5): 1195–1201.
- [27] SCHWARTZ RM, EMERSON SG, CLARKE M.F., PALSSON B.O. *In vitro* myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factor. *Blood* 1991; **78**: 3155–3161.
- [28] SCHWINGER W, BEBESCH M, LACKNER H, KERBL R., WALCHER M., URBAN C.: Comparison of different methods of separation and *ex vivo* expansion of cord blood progenitor cells. *Ann Hematol* 1999; **78**(8): 364–370.
- [29] SMOGORZEWSKA EM, BARSKY LW, CROOKS GM, WEINBERG KI. Purification of hematopoietic stem cells from humane bone marrow and umbilical cord blood. *J Immunol* 1997; **22**: 232–239.
- [30] SROUR EF, ABONOUR R, CORNETTA K, TRAYCOFF C. *Ex vivo* Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Are We There Yet? *J Hematother* 1999; **8**: 93–102.
- [31] TARACH JS. Hematopoetyczne komórki macierzyste szpiku kostnego i antygen CD34. *Acta Hematologica* 1999; **30**: 225–233.
- [32] Van den OUDENRIJN S, von dem BORNE AE, de HAAS M. Difference in megakaryocyte expansion potential between CD34⁺ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Exp Hematol* 2000; **28**: 1054–1061.
- [33] VAVROVA J, VOKURKOVA D, MAREKOVA M, BLAHA M, JEBAVY L, FILIP S. Antiapoptotic Cytokine IL-3 + SCF + FLT3L Influence on Proliferation of Gamma-Irradiated AC133⁺/CD34⁺ Progenitor Cells. *Folia Biolog* 2002; **48**: 51–57.

*Adres autora: Zakład Transplantologii USD
30-606 Kraków, Ul. Wielicka 265*

AUGMENTACJA TKANKI KOSTNEJ SZCZĘK PRZY WYKORZYSTANIU AUTOLOGICZNEGO SZPI- KU, KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZY- STYCH ORAZ KONCENTRATU KRWINEK PŁYTKO- WYCH: ANALIZA FRAKTALNA OBRAZÓW RTG*

MAXILLARY BONE AUGMENTATION USING AUTOLOGIC BONE
MARROW, HEMOPOIETIC STEM CELLS AND PLATELET RICH PLASMA:
FRACTAL ANALYSIS OF RADIOGRAMS

Andrzej WOJTOWICZ¹, Sławomir CHABEREK²,
Magdalena KISŁOWSKA-SYRYCZYŃSKA¹, Elżbieta. URBANOWSKA³,
Wiesław WIKTOR-JĘDRZEJCZAK³, Kazimierz OSTROWSKI⁴

¹ Zakład Chirurgii Stomatologicznej, Akademia Medyczna w Warszawie;

² Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. prof. A. Grucy w Otwocku,

³ Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, Bank Komórek
Macierzystych, Akademia Medyczna oraz ⁴ Zakład Histologii i Embriologii,
Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: Problem augmentacji tkanki kostnej w obrębie szczęk jest szczególnie istotny w aspekcie rehabilitacji implantologiczno-protetycznej, przy braku wystarczającej ilości tkanki kostnej niezbędnej do umocowania implantów stomatologicznych. W ostatnich latach zaproponowano metodologię inżynierii tkankowej pozwalającą na odbudowę pionową i poziomą wyrostka zębodołowego i części zębodołowej szczęk. W pracy wykorzystano trzymiesięczne obserwacje po przeszczepieniach: 1) autologicznego szpiku, 2) frakcji izolowanych ze szpiku autologicznego populacji komórek jednojądrzastych z określoną liczbą komórek macierzystych (CD 34) oraz 3) masy płytkowej (PRP, *platelet rich plasma*). Przeszczepy zakładano w łoża kostne po usuniętych torbielach szczęk. Nośnikiem dla wymienionych przeszczepów były fragmenty wołowej odbiałzonej kości Bio-Oss (Geistlich). Dla analizy porównawczej efektu augmentacyjnego wymienionych przeszczepów zastosowano nieinwazyjną analizę matematyczną obrazów rtg okolicy augmentowanej *versus* okolicy kontrolnej-kontralateralnej. Dzięki zastosowaniu algorytmów analizy fraktalnej możliwe stało się porównanie stopnia samoodtwarzania i pod-

*Badania finansowane w ramach realizacji projektu zamawianego nr PBZ-KBN-083/P05/2002.

bieństwa nowopowstających struktur w stosunku do struktur już istniejących. Ilość takich „samoreplikacji” daje się ocenić obiektywnie stosując analizę fraktalną. Analiza fraktalna wykazała wyraźne różnice w odbudowie architektury beleczek kostnych odtwarzanych przy użyciu poszczególnych przeszczepów, w porównaniu z prawidłową kością okolicy kontralateralnej. Otrzymane wyniki analizy wskazują, iż stopień złożoności i samopowtarzalności odtwarzanej struktury nowopowstających beleczek kostnych jest najbardziej zbliżony do struktury kości prawidłowej, dla struktury odtworzonej po zastosowaniu masy płytkowej. Największe różnice między odtwarzaną strukturą a strukturą prawidłową wystąpiły przy odbudowie po zastosowaniu szpiku autologicznego, mniejsze różnice stwierdzono po przeszczepieniu komórek jednojądrzastych szpiku, zawierających określoną populację komórek macierzystych CD 34. Wydaje się, iż w procesie sterowanej regeneracji kości (GBR, *guided bone regeneration*) istotna jest obecność aktywnych czynników wzrostowych, głównie PDGF i innych, np. BMPs, TGFs, IGF obecnych w płytkach krwi i uwalnianych w krótkim czasie. Aktywacja komórek macierzystych wymaga prawdopodobnie dłuższego czasu dla syntezy i wydzielania tkankowych stymulatorów, czynników parakrynowych, a także – być może – obecności innych komórek.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, przeszczepianie szpiku, masa płytkowa PRP, augmentacja kości szczęk, Bio-Oss.

Key words: stem cells, bone marrow transplantation, platelet rich plasma PRP, jaw bone augmentation, Bio-Oss.

WSTĘP

Terapeutyczne wykorzystanie komórek macierzystych do rutynowego zastosowania w klinice ogranicza się w chwili obecnej do przeszczepów krwiotwórczych, czyli tzw. przeszczepiania szpiku, zabiegu, który, jak dotychczas sadzono, miał odtwarzać wyłącznie elementy morfotyczne krwi i układu odpornościowego. Badania ostatnich lat pozwalają na weryfikację dotychczasowych poglądów i wprowadzania do zastosowania klinicznego nowych metod terapeutycznych, np. korekty uszkodzeń ubytków kostnych w chirurgii stomatologicznej.

Potencjalne źródła komórek macierzystych umożliwiające ich wykorzystanie muszą odpowiadać pewnym kryteriom. Przede wszystkim musi być możliwe pozyskanie wystarczającej dla celów praktycznych liczby komórek zdolnych do różnicowania się w pożądaną tkankę docelową. Innym wymogiem jest wdrożenie techniki pobrania, która pozwoli na pozyskanie komórek autologicznych pacjenta w sposób nieprzynoszący mu szkody przewyższającej potencjalne korzyści terapeutyczne. Augmentacja tkanki kostnej szczęki lub zuchwy jest w istocie efektem regeneracji tkanki kostnej zgodnie z zasadami biomimetyki. Proces regeneracji można pobudzać w rozmaity sposób. Proces regeneracji (rekonstrukcja kształtu i funkcji uszkodzonych tkanek) znacznie różni się od reparacji, która najczęściej występuje w procesie naturalnego gojenia się, odtwarzając ciągłość tkanek bez przywrócenia im zróżnicowania i funkcji, najczęściej w postaci blizny łącznotkankowej. Regeneracja tkanek jest możliwa dzięki aktywacji wielu czynników wzrostowych oddziałujących najczęściej autokrynowo lub parakrynowo [11–15].

Inżynieria tkankowa, wykorzystująca osiągnięcia medycyny i chirurgii, biologii komórki i biologii molekularnej, chemii polimerów oraz fizjologii, w praktyce oznacza rekonstrukcję tkanek na wzór procesów embrionalnych – jest powtórzeniem ich tworzenia się i różnicowania („biomimetyka”) [20,25]. Na potrzeby kliniczne wprowadzono pojęcie sterowanej regeneracji tkanek (GTR, *guided tissue regeneration*) i węższe określenie sterowanej regeneracji kości (GBR, *guided bone regeneration*) [6–10,15,20,32]. Procesy te zależą od dostarczonych lub stymulowanych miejscowo czynników wzrostowych, białek morfogenetycznych kości (BMPs), sterujących kolejnością tworzenia i różnicowania się tkanek [22,27,32].

Marx i wsp.[21,23] oraz Lynch i wsp.[20] zaproponowali na potrzeby GTR i GBR wykorzystanie autogennej masy płytkowej, uzyskiwanej przez zagęszczanie płytek krwi w wyniku tzw. tromboforezy. Trombocyty zawierają w znacznym stężeniu m.in. naturalne, tkankowe czynniki wzrostowe: PFGF (*platelet-derived growth factor* – płytkopochodny czynnik wzrostu), TGFβ (*transforming growth factor beta* – transformujący czynnik wzrostu beta), niezbędne w procesach regeneracji tkanek [1–4,8,16, 17, 28–31].

Z kolei zdolność przypisywana komórkom macierzystym decyduje o możliwości użycia ich do odtwarzania utraconych tkanek [33]. Uważa się, iż istnieją co najmniej dwa główne rodzaje komórek macierzystych: embrionalne (przez wielu badaczy uważane za tzw. prawdziwe komórki macierzyste) i nieembrionalne (dorosłe lub rzekome komórki macierzyste).

Komórki macierzyste wykazują kilka charakterystycznych cech:

1. Są klonogenne, oznacza to, iż mogą w wyniku podziałów i różnicowania stworzyć zespół identycznych komórek wchodzących w skład określonej specjalizującej się lub wyspecjalizowanej tkanki.
2. Są samoodnawiające się – mają zdolność do powielania się w razie potrzeby.
3. Mają zdolność do różnicowania się poza szpikiem.
4. Są identyfikowalne w narządach, co pozwala na regenerację określonych tkanek/narządów w określonych warunkach.
5. Mogą być izolowane, a przeszczepianie ektopowe komórek macierzystych pochodzących ze szpiku (BMSC, *bone marrow stem cells*) powoduje powstanie tkanki kostnej i szpiku.

O ile embrionalne komórki macierzyste mają zdolność przekształcania się we wszystkie rodzaje komórek organizmu, to ich pobranie prowadzi do zniszczenia embrionu, co stwarza problemy natury etycznej. Pozyskanie nieembrionalne „dojrzałych” komórek macierzystych nie powoduje tego problemu, lecz komórki te mają ograniczone właściwości w porównaniu z embrionalnymi.

Celem badań było określenie algorytmu postępowania przy wykorzystaniu hemopoetycznych komórek macierzystych w augmentacji kości szczęk i analiza porównawcza z efektami przeszczepienia autologicznego szpiku i koncentratu autologicznych krwinek płytkowych.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

U 17 pacjentów, mężczyzn wykonano zabiegi cystektomii. Torbiele zębopochodne, zapalne były umiejscowione w przednim odcinku żuchwy. Pacjenci zostali wyselekcjonowani tak, aby wielkość torbieli była zbliżona. Oceniając radiologicznie średnice torbieli, przy założeniu ich równomiernego rozprężającego wzrostu we wszystkich kierunkach, wahała się ona w granicach od 15 mm do 21 mm (średnio $18,0 \pm 3,0$ mm średnicy). Pacjenci otrzymali na piśmie informację o planowanej procedurze, podpisali zgodę na zabieg na podstawie akceptacji Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Warszawie (nr KB/230/2002). W trakcie zabiegów operacyjnych, wykonywanych w klasyczny sposób, w znieczuleniu miejscowym i przewodowym wyłuszczano torbiel, oczyszczano łożę kostne z tkanek miękkich zapalnie zmienionych. W tak przygotowane łożę zakładano trzy rodzaje przeszczepów augmentujących tkankę kostną:

- 1) koncentrat autologicznych krwinek płytkowych (PRP, *platelet rich plasma*) + nośnik Bio-Oss spongiosa 0,25–1 mm średnicy ziaren (Geistlich, odbiałczona sproszkowana kość wołowa), oznaczano liczbę płytek w przeszczepie (4 pacjentów, tab. 1),
- 2) szpik autologiczny + Bio-Oss, oznaczano liczbę komórek jądrzastych (NC), jednojądrzastych (MNC) oraz komórek CD34+ (4 pacjentów, tab. 2),
- 3) izolowana ze szpiku autologicznego frakcja komórek jądrzastych (NC), w której oceniano liczbę komórek CD 34+ (9 pacjentów, tab. 3).

Masa płytkowa była uzyskiwana metodą automatycznej trombocytoferazy z wykorzystaniem separatora komórkowego (COBE-SPECTRA) z odpowiedniej objętości krwi pacjenta. Krew pełna pobierana jest przez cały czas trwania zabiegu. Po zmieszaniu z antykoagulantem (ACD-A) podlega ona rozfrakcjonowaniu na koncentrat krwinek czerwonych i osocze bogatopłytkowe (PRP). Koncentrat krwinek czerwonych i osocze pozbawione elementów komórkowych są sukcesywnie zwracane

TABELA 1. Zestawienie liczb płytek krwi zawartych w przeszczepie masy płytkowej wykorzystanym do zabiegu augmentacji kości

Lp.	Objętość początkowa preparatu [ml]	Objętość końcowa preparatu [ml]	PLT x 10 ⁶ /ml	PLT x 10 ¹¹ /prep.
1	100	10	8 000	0,8
2	100	10	11 000	1,1
3	100	10	19 000	1,9
4	100	10	22 000	2,2

PLT – liczba płytek krwi uzyskanych w trakcie zabiegu trombocytoferazy

TABELA 2. Zbiórcze zestawienie liczby komórek jądrzastych, jednojądrzastych oraz krwiotwórczych komórek macierzystych uzyskanych ze szpiku autologicznego i wykorzystanych do zabiegu augmentacji kości

Lp.	Objętość końcowa [ml]	NC x 10 ⁶ /ml	NC x 10 ⁸ /prep.	MNC x 10 ⁶ /ml	MNC x 10 ⁸ /prep.	% CD 34+	CD 34+ x 10 ⁶ /prep. NC
1	20	28,4	5,7	9,5	1,9	0,4	2,3
2	20	1,9	2,4	4,0	0,8	0,3	0,7
3	20	13,5	2,7	0,6	1,1	0,8	2,1
4	20	25,8	5,8	8,5	1,7	0,5	2,6

NC – liczba komórek jądrzastych, MNC – liczba komórek jednojądrzastych,
CD 34+ – liczba krwiotwórczych komórek macierzystych

do krwioobiegu pacjenta. Tak uzyskany preparat płytek krwi był następnie zagęszczany przez wirowanie i zawieszany w osoczu własnym w objętości 10 ml.

Szpic autologiczny pobierano w znieczuleniu miejscowym przez nakłucie kolców biodrowych tylnych i aspirację z jamy szpikowej dwukrotnie po 10 ml materiału do 2 probówek polipropylenowych z podłożem RPMI-1640 (GIBCO) i dodatkiem antykoagulantu, bez ochrony antybiotykowej.

Frację komórek jądrzastych (NC) izolowano ze szpiku przez wirowanie na gradiencie gęstości (Ficoll/Uropolinum). Wyizolowaną frakcję komórek mononuklearnych (MNC, pozbawiona granulocytów) zawierającą krwiotwórcze komórki macierzyste CD34+ dwukrotnie odwirowywano (1800 obr./min przez 10 min) zagęszczano i zawieszano w osoczu autologicznym w objętości 5 ml. W przypadku wykonywania zabiegu chirurgicznego w dniu następnym po pobraniu szpiku, uzyskane komórki mononuklearne umieszczano w pożywce odżywczej i przetrzymywano w warunkach kontrolowanej temperatury 4°C. W dniu zabiegu komórki odpłukiwano z pożywki i zawieszano w osoczu autologicznym. Tak przygotowany preparat poddawano ocenie morfologicznej i cytometrycznej.

Za pomocą cytometru przepływowego (FACScan, Becton Dickinson, USA) oceniano ekspresję antygeny powierzchniowego CD34 na komórkach krwiotwórczych. W tym celu zawiesinę komórek mononuklearnych rozcieńczano, inkubowano z przeciwciałem monoklonalnym anti-CD34 połączonym z fykoerytryną –PE (Becton Dickinson, anti-HPCA2) w temp. 4°C w ciągu 30 min. Równocześnie dodawano do badanej próbki przeciwciało anti CD45. Po inkubacji, próbki płukano dwukrotnie w PBS z 1% albuminą i zawieszano w paraformaldehydzie. Próbki wprowadzono do cytometru przepływowego i standardowo zbierano 75 000 komórek mononuklearnych, które dodatkowo „bramkowano” w układzie SSC. Wynik odczytywano jako odsetek komórek CD34 dodatnich w stosunku do komórek CD45 dodatnich.

Szpic i masa płytkowa pobierane były w dniu poprzedzającym zabieg PRP. W dniu zabiegu PRP, szpic i frakcja komórek jądrzastych zawierające krwiotwórcze komórki

TABELA 3. Zbiorcze zestawienie liczby komórek jądrzastych, jednojądrzastych oraz krwiotwórczych komórek macierzystych zawartych w wyizolowanej frakcji szpiku autologicznego wykorzystanej do zabiegu augmentacji kości

Lp.	Objętość końcowa [ml]	NC x 10 ⁶ /ml	NC x 10 ⁸ /prep.	MNC x 10 ⁶ /ml	MNC x 10 ⁸ /prep.	% CD34+	CD 34+ x 10 ⁶ /prep. NC
1	5	30,4	1,5	18,8	0,9	1,85	2,8
2	5	15,1	0,7	10,7	0,5	1,2	0,8
3	5	25,9	1,3	8,5	0,4	0,5	0,7
4	5	6,5	0,3	3,2	0,1	0,4	0,2
5	5	11,8	0,6	7,9	0,4	0,8	0,5
6	5	9,1	0,5	5,6	0,3	1,2	0,6
7	5	20,7	1,0	11,1	0,6	0,6	0,6
8	5	41,1	2,0	15,4	0,8	0,4	0,8
9	5	58,5	2,9	38,6	1,9	0,3	0,8

NC – liczba komórek jądrzastych, MNC – liczba komórek jednojądrzastych

CD 34+ – liczba krwiotwórczych komórek macierzystych

macierzyste były *ex tempore* mieszane z Bio-Oss (0,5 g / na przeszczep) . Liczba płytek krwi w PRP wahała się od 0.8 do 2.2 x10¹¹ w preparacie (tab.1).

Po założeniu przeszczepu w łożo kostne, przeszczep zamykano od strony okostnej autogenną błoną fibrynową (masa płytkowa, trombina, CaCl), oraz resorbowalną błoną zaporową Bio-Gide 25x25 mm (Geistlich, Biomaterials), umieszczając jej brzegi podokostnowo. Okostną i błonę śluzową zaszywano w sposób klasyczny. Po tygodniu zdejmowano szwy.

Badania radiologiczne

Wykonano serię zdjęć pantomograficznych i zębowych metodą kąta prostego, przy wykorzystaniu cyfrowej metody Vix-Win. Gentex 2000 (dla zdjęć pantomograficznych), oraz radiowizjografii Planmeca Diamaxis dla zdjęć zębowych. Zdjęcia wykonywano przed zabiegiem, tydzień po zabiegu oraz trzy miesiące po zabiegu.

Analiza obrazu

Do oceny obrazów rentgenowskich struktury kostnej wykorzystano analizę fraktalną. Podstawowym pojęciem teorii fraktali jest wymiar fraktalny D. Za pomocą wymiaru fraktalnego teoria fraktali określa stopień złożoności różnego typu obiektów (matematycznych, geometrycznych, biologicznych, fizycznych) czy procesów. Podstawowe cechy fraktali to: duży stopień różnorodności, samopodobieństwo w szerokim zakresie skal – można powiedzieć, że ich stopień nieregularności jest identyczny w różnych skalach, są obiektami, których wymiar zwany wymiarem

fraktalnym nie jest liczbą całkowitą. Analiza fraktalna obrazów radiologicznych struktury kostnej jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Buckland-Wright J.C. i wsp. [34] stwierdzili, że za pomocą wymiaru fraktalnego można ilościowo opisać zmiany w strukturze kości u pacjentów z osteoartrozą. Caligiuri P. i wsp. [35] zajęli się określeniem stopnia ryzyka złamań osteoporotycznych przy użyciu do tego celu analizy fraktalnej. Fazzalari i Parkinson [36] zastosowali analizę fraktalną do badań mikrofotografii próbek kostnych i potwierdzili związek między wartością wymiaru fraktalnego a strukturą tkanki kostnej. W pracy zastosowano metodę wyznaczania wymiaru fraktalnego opartą na średniej bezwzględnej różnicy poziomów szarości [37–39]. Dla obrazów struktur o małej wariancji intensywności wymiar fraktalny D będzie duży, czego należy się spodziewać przy strukturach o wysokim stopniu złożoności i samopowtarzalności. W przypadku dużej wariancji intensywności wymiar fraktalny D przybiera małe wartości, co jest typowe dla struktur o niskim stopniu złożoności i niskiej samopowtarzalności.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono stosując analizę wariancji (ANOVA). Testy analizy wariancji służą do porównywania wielu grup pomiarów. Zastosowanie analizy wariancji pozwala na badanie różnic wartości średniej wymiaru fraktalnego dla określonych grup badawczych. Poza wskazaniem, czy takowe różnice występują ANOVA, pozwala na określenie różnic między poszczególnymi grupami, jeżeli takowe istnieją.

Przebieg analizy

Analizę prowadzono na cyfrowych, zębowych obrazach rentgenowskich uzyskanych u pacjentów poddanych leczeniu. Zdjęcia zębowe wykonano przy użyciu aparatu Planmeca o rozdzielczości 350 dpi przy znormalizowanych parametrach ekspozycji dla wszystkich projekcji. Obrazy znormalizowano pod względem kontrastu, w celu wyeliminowania ewentualnych różnic, stosując stopnie aluminiowe (*aluminum step wedge*). Do normalizacji użyto również procedury normalizacyjne oferowane przez program do cyfrowej obróbki obrazu MULTI-SCAN. Po wyborze obszarów zainteresowania z rejonu odtwarzanej struktury dla badanych przeszczepów oraz obszarów kontralateralnych określanych jako kontrolne obliczono wartości wymiarów fraktalnych dla badanych obszarów. Następnie przy użyciu analizy wariancji przeprowadzono porównanie między wartościami średnimi wymiaru fraktalnego dla poszczególnych grup badawczych.

WYNIKI

Ocena kliniczna pozwoliła na stwierdzenie, iż w żadnym z analizowanych przypadków nie wystąpiły powikłania, a leczenie przebiegało prawidłowo.

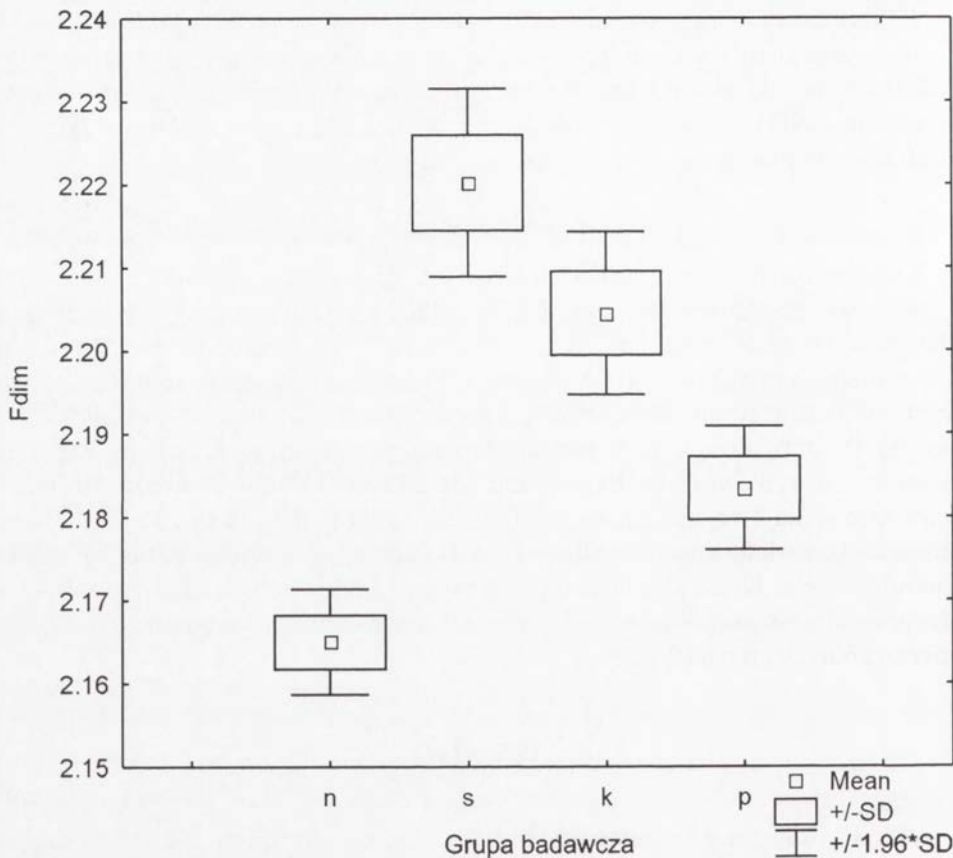
Analizę obrazów rtg, mającą na celu ocenę efektów leczenia, przeprowadzono za pomocą analizy wartości wymiaru fraktalnego badanych obrazów radiowizyjnych.

TABELA 4. Wartości średnich i odchyłeń standardowych wymiaru Fraktalnego (Fdim) dla poszczególnych grup pacjentów/przeszczepów

Grupa badawcza	Wymiar fraktalny (Fdim)	
	wartość średnia	odchylenie standardowe
n – kontrola	2,16500	0,00648
s – szpik	2,22025	0,01152
k – kom. macierzyste	2,20566	0,01193
p – masa płytkowa	2,18533	0,00814

Nie analizowano tą metodą zdjęć pantomograficznych, ponieważ struktury kostne z definicji są powiększone w wymiarze horyzontalnym 1,7 razy w tym rodzaju diagnostyki rtg. Dokonano porównania struktury beleczek kostnych (po 4 obszary kości na każdym rtg strony operowanej i 4 obszary kostne strony kontralateralnej-kontrolnej, 16 analizowanych obrazów rtg kości strony operowanej i 16 kontrolnych w każdej

Wykres wartości średnich wymiaru fraktalnego (Fdim)



RYCINA 1. Analiza fraktalna obrazów tkanki kostnej na zdjęciach cyfrowych rtg: kontrolnych (n) i augmentowanych przeszczepieniami szpiku (s), komórek macierzystych (k), masy płytkowej (p), wartość średnia wymiaru fraktalnego, wartość odchylenia standardowego

TABELA 5. Test jednorodności wariancji pozwala na zastosowanie analizy wariancji (ANOVA), $p > 0,05$

	Suma kwadratów	Liczba stopni swobody	Średnie kwadraty	Suma kwadratów	Liczba stopni swobody	Średnie kwadraty	Wartość testu F	Poziom prawdopodobieństwa p
	pomiędzy grupami			wewnątrz grup				
<i>Fdim</i>	0,00005	3	0,00001	0,00009	10	0,00001	1,99814	0,17828

z trzech grup badanych, łącznie wykonano i analizowano 96 obszarów kości na cyfrowych obrazach rtg, wykonanych w cyfrowym systemie radiowizjografii (12 zdjęć zębowych):

- 1) grupa kontrolna, kość prawidłowa, 3 x 16 obrazów – „n”,
- 2) przeszczep szpiku wzbogacony o komórki macierzyste, 16 obrazów – „k”,
- 3) przeszczep szpiku autologicznego, 16 obrazów – „s”,
- 4) przeszczep koncentratu krwinek płytkowych PRP, 16 obrazów – „p”.

Badany obszar kostny miał rozmiar 54x54 punkty. Parametrem opisującym badaną strukturę była wartość wymiaru fraktalnego. Otrzymane wyniki wartości średniego wymiaru fraktalnego zebrano w tabeli 4. Graficznie wyniki zostały przedstawione na wykresie (ryc.1). Wstępna analiza wyników wykazuje różnice pomiędzy poszczególnymi grupami odpowiadającymi stosowaniu poszczególnych materiałów użytych do rekonstrukcji uszkodzonej struktury kostnej.

Najbardziej zbliżona do struktury prawidłowej jest struktura beleczkowa odtworzona na bazie masy płytkowej PRP (p), następnie struktura odtworzona z zastosowaniem komórek macierzystych (k). Największe różnice wystąpiły między strukturą normalną a strukturą odtworzoną z zastosowaniem komórek szpiku (s). Analiza wykresu (ryc.1) i wyników tabeli 4 wskazuje również na występowanie różnic między poszczególnymi metodami. W szczególności między strukturą odtworzoną na podstawie masy płytkowej a pozostałymi metodami. Z analizy wykresu można spodziewać się również nieznacznych różnic między strukturą odtworzoną na podstawie komórek macierzystych a strukturą odtworzoną na podstawie komórek szpiku.

TABELA 6. Wyniki analizy wariancji (ANOVA). Analiza wskazuje różnice znamienne statystycznie między wartościami średnimi wymiaru fraktalnego (*Fdim*), $p < 0,05$

	Suma kwadratów	Liczba stopni swobody	Średnie kwadraty	Suma kwadratów	Liczba stopni swobody	Średnie kwadraty	Wartość testu F	Poziom prawdopodobieństwa p
	pomiędzy grupami			wewnątrz grup				
<i>Fdim</i>	0,00675	3	0,00225	0,00094	10	0,00009	23,8960	0,00007

TABELA 7. Wyniki analizy kontrastów ukazują istotne różnice między grupami: n-s, n-k, n-p, s-p, k-p ($p < 0,05$), brak różnic między grupami s-k ($p > 0,05$).

	n – kontrola	s – szpik	k – kom. macierzyste	p – masa płytkowa
	M = 2,1650	M = 2,202	M = 2,057	M = 2,1853
n – kontrola	X	0,00001	0,00026	0,02073
s – szpik	0,00001	X	0,07750	0,00082
k – kom. macierzyste	0,00026	0,077501	X	0,02809
p – masa płytkowa	0,02073	0,00082	0,02809	X

W celu dokładnego zbadania występujących różnic przeprowadzono ocenę z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA). Przeprowadzony test jednorodności wariancji (tab. 5) wykazuje, że został spełniony podstawowy warunek pozwalający na zastosowanie tej metody analizy statystycznej.

Na tej podstawie dokonano analizy wariancji; wyniki przedstawiono w tabeli 6.

Analiza wariancji wykazała istnienie różnic znamienych statystycznie między wartościami średnimi wymiaru fraktalnego dla poszczególnych metod stosowanych do rekonstrukcji struktury kostnej. Skoro analiza wariancji wykazała różnice znamienne statystycznie między poszczególnymi wartościami średnim wymiaru fraktalnego, to powstaje pytanie, które z średnich różnią się między sobą, a między którymi różnice nie występują. W tym celu w następnym etapie analizy wariancji dokonano analizy kontrastów, zwanej często testami wielokrotnych porównań. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 7.

Test wykazał znamienne statystycznie różnice między:

- strukturą kontrolną a strukturą odtworzoną na podstawie komórek macierzystych,
- strukturą kontrolną a strukturą odtworzoną na podstawie komórek szpiku,
- strukturą kontrolną a strukturą odtworzoną na podstawie masy płytkowej,
- strukturą odtworzoną na podstawie masy płytkowej a strukturą odtworzoną na podstawie komórek macierzystych,
- strukturą odtworzoną na podstawie masy płytkowej a strukturą odtworzoną na podstawie komórek szpiku
- analiza nie wykazała różnic znamienych statystycznie w wartościach średnich wymiaru fraktalnego struktury odtworzonej na podstawie komórek macierzystych i struktury odtworzonej na podstawie komórek szpiku.

DYSKUSJA

W świetle zachęcających efektów terapeutycznych prowadzonych zabiegów augmentacji tkanki kostnej szczęk wydaje się, iż metodologia ta, szczególnie wykorzystanie PRP, w najbliższym czasie zostanie zastosowana do rekonstrukcji w chirurgii ortognatycznej, np. do leczenia rozszczepów podniebienia. Efekt komórek macierzystych, aczkolwiek słabszy od masy płytkowej, może być zmodyfikowany przez wprowadzenie komórek stymulowanych *in vitro* lub poprzedzony stymulacją pacjenta czynnikami wzrostowymi. Z punktu widzenia klinicznego, zabiegi augmentacji tkanki kostnej umożliwiają rehabilitację implantologiczną, poza tym, co jest szczególnie istotne, przeciwdziałają powstaniu blizny łącznotkankowej wpuklającej się do jamy po usuniętej torbieli. Mimo tych korzystnych efektów odbudowywania kości nadal nie możemy tego powiedzieć o regulowaniu ilości tkanki łącznej np. dziąseł.

Metody chirurgiczne bywają niewystarczające, a próby odtwarzania błony śluzowej *in vitro*, aczkolwiek obiecujące, nadal nie spełniają oczekiwań chirurga stomatologa.

LITERATURA

- [1] ANTONAIDES HN. Human platelet derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced sub-units. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7314–7317.
- [2] ANTONAIDES HN, WILLIAMS LT. Human platelet derived growth factor: Structure and functions. *Fed Proc* 1983; **42**: 2630–2634.
- [3] BECK LS, DEGUZMAN L, LEE WP. One systemic administration of transforming growth factor-beta, reverses age or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* 1993; **93**: 2841–2849.
- [4] BECK LS, WONG RL, DeGUZMAN L, LEE WP, ONGPIPATTANAKUL B, NGUYEN TH. Combination of bone marrow and TGF-beta1 augment the healing of critical-sized bone defects. *J Pharm Sci* 1998 Nov. **87**(11): 1379–1386.
- [5] BOWEN-POPE DF, VOGEL A, ROSS R. Production of platelet derived growth factor like molecules reduced expression of platelet derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 2396–2400.
- [4] CANALIS E, CENTRELLA M, BUSCH W i wsp. Insuline-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989; **83**: 60–65.
- [5] CAPLAN AI. Bone development and repair. *Bioassays* 1987; **6**: 171–175.
- [6] CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; **9**: 641–650.
- [7] CELESTE AJ, IANNAZZI JA, TAYLOR RC. Identification of transforming growth factor beta to family members present in bone-inductive protein purified bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9843–9847.
- [8] DAVIES JC, BUCKLEY CJ, PER-OLOF B. Compromised soft tissue wounds: Correction of wound hypoxia. W: Hunt TK (ed). *Problem Wounds: The role of Oxygen*. New York: Elsevier, 1988: 143–152.
- [9] DELMAS PD, MALAVAL L. The proteins of bone. *Physiology and Pharmacology of Bone*. Berlin: Springer 1993: 673–724.
- [10] DEQUEKER J. Bone structure and function. *Rheumatology*. St Louis: Mosby, 1994:7–9.
- [11] GREENLAGH DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996; **41**: 159–167.
- [12] HUNT TK, ALLEN O, ZABEL D i wsp. Defences of the wound. *Surgical Infectious Disease*. New York: Appelton-Lange.
- [13] HUSSAIN MZ, LA VAN F, HUNT TK. Wound micro-environment. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*. Philadelphia: Saunders, 1991: 162–196.

- [14] JOHNSON A, HELDIN CH, WASTESON A. The C-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet derived growth factor. *Embryol J* 1984; 921–928.
- [15] JOHNSON K, HUNT TK, MATHES SJ. Oxygen as an isolated variable influences resistance to infection. *Ann Surg* 1988; **208**: 783–787.
- [16] KNIGHTON D, SILVER I, HUNT TK. Regulation of wound healing angiogenesis- Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981; **90**: 262–270.
- [17] KNIGHTON DR, OREDSSON S, BANDA M. Regulation of repair: Hypoxic control of macrophage mediated angiogenesis. Soft and hard tissue repair. New York Praeger, 1984: 41–49.
- [18] LYNCH S, GENCO R., MARX R. Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontitis. Quintessence Pub. Co. Inc. Chicago 1999.
- [19] MARX RE. Radiation injury to tissue. W: Kindwall ER. Hyperbaric Medicine Practice. Flagstaff, AZ: Best Publishing Company, 1994: 447–504.
- [20] MARX RE, CARLSON ER, EICHSTAEDT RM i wsp. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol* 1998; **85**: 638–646.
- [21] MARX RE. Clinical applications of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg* 1994; **21**: 377–392.
- [22] MIYAZANO K, TEN-DIJK P, ICHIYO H i wsp. Receptors for transforming growth factor beta. *Adv Immunol* 1994; **55**: 181–220.
- [23] MOHAN S, BAYLINK DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1991; **263**: 30–43.
- [24] MUSTOE TA, PURDY J, GRAMATES P. Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet derived growth factor-BB: Requirement of an active bone marrow. *Am J Surg* 1989; **158**: 348–350.
- [25] POCHWALSKI M, URBANOWSKA E, WOJTOWICZ A. Inżynieria tkankowa: zastosowania w stomatologii: masa płytkowa, Cz.I. Nowa Stomatologia 2000; 1-2: 17–22.
- [26] PIERCE GF, TARPLEY J, YANAGIHAIN D. PDGF-BB, TGF-beta 1, and basic FGF i dermal wound healing: Neo-vessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992; **140**: 1375–1388.
- [27] ROBERTS AB, SPRON MB. Physiologic actions and clinical applications of transforming growth factor beta (TGF-beta). *Growth Factors* 1993; **8**: 1–9.
- [28] ROSS R, RAINES EW, BOEN- POPE DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; **46**: 155–169.
- [29] SINGH JP, CHAIKIN MA, STILES CD. Phylogenetic analysis of platelet derived growth factor by radio-receptor assay. *J Cell Biol* 1982; **95**: 667–671.
- [30] WERGEDAL JE, MOHAL S, LUNDY M i wsp. Skeletal growth factor and other factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J Bone Miner Res* 1990; **5**: 179–186.
- [31] KOMENDER J. Stem cell research as a base for reconstructive medicine. *Ann Transplant* 2003; **8**: 5–8.
- [32] BUCKLAND-WRIGHT JC, LYNCH AJ, MACFARLANE DG. Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; **55**: 749–755.
- [33] CALIGIURI P, GIGER ML, FAVUS MJ. Multifractal radiographic analysis of osteoporosis. *Med Phys* 1994; **21**: 503–508.
- [34] FAZZALARI NL, PARKINSON IH. Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 632.
- [35] SAMARABANDU J i wsp. Analysis of bone X-Rays using morphological fractals. *IEEE Trans Med Imaging* 1993; **12**, 3: 466–470.
- [36] SANDERS H, CROCKER J. A simple technique for the measurement of fractal dimension in histopathological specimens. *J Pathol* 1993; **163**: 383.
- [37] SOUTHARD TE, SOUTHARD KA. Detection of simulated osteoporosis in maxillae using radiographic texture analysis. *IEEE Trans Biomed Eng* 1996; **43**, 2: 123–131.

02-006 Warszawa ul. Nowogrodzka 59,
e mail: awojt@kcs.amwaw.edu.pl,

BADANIE POTENCJALNEJ PRZYDATNOŚCI KLINICZNEJ KOMÓREK MACIERZYSTYCH UZYSKIWANYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ

RESEARCH ON THE POTENTIAL CLINICAL USEFULNESS
OF STEM CELLS COLLECTED FROM THE CORD BLOOD

Zygmunt POJDA^{1,2}, Eugeniusz K. MACHAJ^{1,2}, Agnieszka GAJKOWSKA¹,
Tomasz OŁDAK^{1,2}, Marzena JASTRZEWSKA¹

¹Zakład Hematologii Doświadczalnej i Bank Krwi Pępowinowej
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
²Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie

Streszczenie: Krew pępowinowa zawiera komórki macierzyste zdolne do repopulacji układu krwiotwórczego i wytwarzania dojrzałych komórek należących do innych tkanek. Podczas gdy krwiotwórcze komórki macierzyste są stosunkowo dobrze scharakteryzowane, to obecność innych (niekrwiotwórczych) budzi wciąż wiele kontrowersji. Jakkolwiek istnieją doniesienia o obecności w krwi pępowinowej odpowiedników mezenchymalnych komórek macierzystych dorosłych, to niektórzy autorzy negują ich istnienie, a inna hipoteza zakłada, że wytwarzane tkanki (nerwowa, kostna, mięśniowa itp.) mogą powstawać jako efekt tzw. plastyczności krwiotwórczej komórki macierzystej. W badaniach własnych zidentyfikowano subpopulację komórek hodowanych jako przylegające do plastyku, zdolnych do wytwarzania co najmniej kilku rodzajów komórek nerwowych. Nie wykazano zdolności transdyferencji populacji komórek krwiotwórczych (CD34⁺, CD45⁺, nieprzylegające *in vitro*) w kierunku komórek nerwowych, ani prekursorów komórek nerwowych (CD34⁻, CD45⁻, przylegające do plastyku) w kierunku różnicowania w linie krwiotworzenia. Autorzy sugerują, że obecność komórek prekursorowych dla innych tkanek niż krwiotwórcza wynika z obecności w krwi pępowinowej odrębnych populacji komórek macierzystych, a nie z efektu plastyczności komórek krwiotwórczych.

Słowa kluczowe: krew pępowinowa, komórka macierzysta, plastyczność komórek macierzystych

Summary: In the cord blood there exist stem cells capable of repopulation of hematopoietic system and of production of cells belonging to other tissues. Whereas hematopoietic stem cells are relatively well characterized, a presence of the other (nonhematopoietic) cells still causes many controversies. There are papers describing the cord blood cells being equivalent to adult mesenchymal stem cells, however some authors deny their existence, and according to the other hypothesis assume that the other tissues

*Praca finansowana z Grantu KBN PBZ-501/Z/13/6/2002.

(nerve, bone, muscle etc.) may be produced as the effect of the so-called stem cell plasticity effect. We have identified plastic-adherent stem cell subpopulation capable to produce at least several types of nerve cells. It was impossible to stimulate *in vitro* transdifferentiation of hematopoietic cells (CD34⁺, CD45⁺, plastic-nonadherent) into neurogenesis, nor neural precursors (CD34⁻, CD45⁻, plastic-adherent) into hematopoietic differentiation. We suggest that the presence non-hematopoietic precursors in cord blood results from the existence of separate stem cell populations, not from the hematopoietic stem cell plasticity phenomenon.

Key words: Cord blood, Stem cell, Stem cell plasticity.

WSTĘP

Krwia pępowinową nazywana jest porcja krwi możliwa do pozyskania z naczyń łożyska i łożyskowej części pępowiny po odpepnieniu noworodka. Zawiera ona, podobnie jak szpik kostny, wysoki odsetek (0,9–1,5% całkowitej liczby mononuklearów) komórek macierzystych. Cykl badań, których nasilenie przypadało na lata osiemdziesiąte ubiegłego wieku, wykazał, że w badaniach *in vitro* komórki macierzyste krwi pępowinowej zachowują się podobnie jak komórki szpiku, cechując się w dodatku większym potencjałem proliferacyjnym i mniejszymi wymogami w odniesieniu do obecności w środowisku hodowli czynników wzrostu (cytokin). Przesłanki doświadczalne pozwoliły na wykorzystanie komórek krwi pępowinowej jako materiałów do przeszczepów krwiotwórczych – od pierwszego zabiegu przeszczepienia w roku 1988 do chwili obecnej wykonano ich ok. 3 000.

Przeszczepianie komórek krwi pępowinowej, będące, podobnie jak przeszczepy szpiku, metodą leczenia ponad 100 chorób, wykonuje się głównie u dzieci. Powodem jest stosunkowo niewielka liczba komórek macierzystych możliwych do uzyskania z pojedynczej porcji krwi pępowinowej – dane empiryczne (EUROCORD) wskazują, że optymalne wyniki dają zabiegi przeszczepienia nie mniej niż $3,7 \times 10^7$ krwinek białych (WBC) w przeliczeniu na kilogram ciała biorcy. Problemowi temu mogą zaradzić zabiegi przeszczepiania kilku połączonych porcji komórek równocześnie, aczkolwiek dotychczas prezentowane wyniki nie dają możliwości jednoznacznej oceny potencjalnych korzyści tej metody. Niezależnie od specyfiki komórek macierzystych krwi pępowinowej (większy potencjał proliferacyjny, dłuższe telomery, aktywna telomeraza i mniejsze wymogi odnośnie obecności czynników wzrostowych w porównaniu z komórkami szpiku dorosłych), jedyną dojrzałą aplikacją z użyciem komórek krwi pępowinowej jest przeszczepianie w celu odnowy układu krwiotwórczego, podobnie jak w tradycyjnych „przeszczepach szpiku”.

Komórki macierzyste krwi pępowinowej – heterogenne subpopulacje czy „plastyczność”?

Od momentu identyfikacji obecności komórek macierzystych we krwi pępowinowej zakładano (co potwierdzały obserwacje empiryczne), że ich potencjał różnicowania ogranicza się do układu krwiotwórczego. Dowodem na to były zarówno wyniki doświadczeń *in vitro*, jak efekty leczenia przeszczepami chorych wymagających odnowy funkcji szpiku [1]. Procedury pozyskiwania, izolacji i przechowywania komórek

macierzystych krwi pępowinowej ukierunkowane były na optymalizację pozyskania i przechowania komórek o fenotypie CD34⁺, nieprzylegających do plastyku. Istnienie komórek macierzystych szpiku kostnego dorosłych zdolnych do różnicowania się w kierunku innych niż krwiotwórcze linii komórkowych (tzw. mezenchymalne komórki macierzyste) [14] zainicjowało poszukiwanie ich odpowiedników we krwi pępowinowej. W roku 2001 zespół Sanchez-Ramosa [12], a w roku następnym zespół autorów niniejszej pracy we współpracy z grupą Domańskiej-Janik [2] wykazały obecność we krwi pępowinowej komórek zdolnych do różnicowania się w komórki nerwowe. Zespół Sanchez-Ramosa stymulował nieseparowane na frakcje komórki jednojądrzaste, nam natomiast udało się wykazać, że komórki zdolne do różnicowania się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty pochodzą z frakcji komórek CD34⁻ rosnących w postaci warstwy przylegającej do plastyku, podobnie jak mezenchymalne komórki macierzyste szpiku dorosłych. Pierwszą pracą wykazującą istnienie we krwi pępowinowej komórek będących odpowiednikiem mezenchymalnej komórki macierzystej dorosłych jest maszynopis oczekujący na druk w *Blood*, autorstwa Lee i wsp. [6]. Wykazali oni, że komórki, hodowane jako frakcja przylegająca do plastyku, zdolne są do różnicowania nie tylko w kierunku kości, chrząstki i tkanki tłuszczowej (atrybuty mezenchymalnej komórki macierzystej szpiku dorosłych), ale również do produkcji potomstwa o morfologii neurogleju i hepatocytów. Z uwagi na różnorodne możliwości kierunkowania się tych komórek autorzy sugerują, że mogą one być „więcej niż mezenchymalnymi” komórkami macierzystymi.

Aktualnie istnieje głęboka kontrowersja dotycząca hipotetycznego zjawiska tzw. „plastyczności” komórek macierzystych [10]. Zwolennicy istnienia plastyczności zakładają, że w odpowiednich warunkach komórka macierzysta zdolna jest do tzw. transdyferencjacji, czyli przekierkowania z już obranej drogi różnicowania na różnicowanie w inną tkankę. Zjawisko miałoby być możliwe dzięki rearanżacji aktywności odpowiedzialnych za różnicowanie genów. Inna hipoteza zakłada możliwość tzw. dedyferencjacji (polskimi odpowiednikami obu procesów byłyby „transróżnicowanie” i „odróżnicowanie”?) czyli cofnięcia się już ukierunkowanej komórki do stadium komórki multipotencjalnej, a następnie ukierunkowanie w inną linię dojrzewania. Wczesne doniesienia opisujące efekty zjawiska plastyczności komórek macierzystych sugerowały możliwość odnowy krwiotworzenia prekursorami komórek nerwowych, mięśniowych itp. – i odwrotnie, możliwość różnicowania komórki krwiotwórczej w kierunku innych tkanek. Prace te niestety obarczone były wieloma błędami. Jednym z nich były badania wykonywane na mniej lub bardziej oczyszczonych populacjach komórek – w takiej sytuacji efekt przypisywany pojedynczej komórce mógł być zależny od współistnienia w badanej populacji kilku komórek macierzystych obdarzonych różnymi cechami kierunkowania się w określone tkanki. Innym błędem był brak analizy (metodą FISH lub kariotypowania) komórek rzekomo uległych transdyferencjacji – w efekcie za takowe uznawano efekty fuzji komórek badanych z natywnymi komórkami (*in vitro* komórkami embrionalnymi, *in vivo* np. hepatocytami czy też komórkami mięśni). Fuzja komórek może być zjawiskiem fizjologicznym (mięsień), może też w terapii komórkowej dawać korzystne efekty, nie ma natomiast nic wspólnego

z postulowaną plastycznością komórki macierzystej. Plastyczność komórek macierzystych nie jest hipotezą akceptowaną przez wszystkich, uważa się również, że może ona być zjawiskiem istniejącym jedynie w dalekich od przypominających fizjologiczne warunkach hodowli *in vitro* lub zgoła być artefaktem. W tym ostatnim przypadku kontrhipotezą jest założenie istnienia u dorosłych ludzi narządowo-specyficznych komórek macierzystych konkurujących między sobą o „nisze”, tzn. struktury podścieliska pozwalające na ich kotwiczenie [11].

Krwiotwórcze komórki macierzyste krwi pępowinowej

Komórki krwi pępowinowej zdolne do odtworzenia układu krwiotwórczego biocy znane są stosunkowo dawno i, jak już wspomniano, rutynowo stosowane do leczenia przeszczepem tych chorób, które dają się leczyć przeszczepieniem szpiku kostnego lub mobilizowanej krwi obwodowej. Ponieważ mają one na powierzchni (podobnie, jak populacja bardziej dojrzałych komórek prekursorowych) antygen CD34, jego oznaczenie zostało przyjęte za rutynową technikę określania liczby komórek macierzystych w przeszczepie. Należy pamiętać, że odsetek „prawdziwych” komórek macierzystych szpiku lub krwi pępowinowej prawdopodobnie nie przekracza 0,01–0,1% komórek CD34⁺, stąd badanie to obarczone jest sporym ryzykiem błędu. Niektóre zespoły zakładają, że miarodajniejszym parametrem korelującym z prawdopodobieństwem sukcesu zabiegu przeszczepienia krwi pępowinowej (a więc i liczbą komórek macierzystych) jest liczba komórek jednojądrzastych w przeliczeniu na kilogram ciężaru ciała biocy. Komórki CD34⁺ krwi pępowinowej są również materiałem wyjściowym dla otrzymywania komórek śródbłonna [8] – nie wykazano, czy frakcja komórek macierzystych śródbłonna różni się od populacji komórek krwiotwórczych.

Niekrwiotwórcze komórki macierzyste krwi pępowinowej

O ile istnienie komórek niekrwiotwórczych w szpiku kostnym dorosłych (mezenchymalne komórki macierzyste) zostało dawno jednoznacznie wykazane i zaakceptowane, obecność ich analogów we krwi pępowinowej do dzisiaj budzi kontrowersje. Jest ona negowana przez niektórych autorów odznaczających się doświadczeniem w pozyskiwaniu i hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku dorosłych [7, 13]. Inne prace [3, 5] wykazywały wprawdzie obecność komórek krwi pępowinowej zdolnych do różnicowania w kierunku potomstwa mającego markery osteo-, neuro- lub adipogenezy, ale nie byli w stanie zróżnicować możliwości istnienia mieszaniny różnych komórek prekursorowych z wariantem obecności jednego typu wielopotencjalnej komórki macierzystej. W naszych doświadczeniach [2] populacja komórek o morfologii mezenchymalnej komórki macierzystej (CD34⁻, CD45⁻, przylegająca do plastyku) różnicowała się w kierunku neuronów, oligodendrocytów i astrocytów, ale nie była badana w aspekcie kierunkowania w inne linie swoiste dla potomstwa teje. Najbardziej przekonującą do tej pory jest wspomniana publikacja Lee i wsp. [6] wykazująca w systemie klonalnym istnienie multipotencjalnej niekrwiotwórczej komórki macierzystej krwi pępowinowej.

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Materiał i metody

Pozyskiwanie komórek krwi pępowinowej. Krew pępowinowa pozyskiwana była po uzyskaniu akceptacji Lokalnej Komisji Etycznej oraz zgody rodzącej na wykorzystanie komórek do celów badawczych. Po urodzeniu łożysko było umieszczane na statywie, sznur pępowinowy odkażano 70% etanolem i nakłuwano naczynia żyłne do uzyskania >40 ml krwi do worka kolekcyjnego zawierającego 23 ml antykoagulanta (CPDA). Czas od pobrania do dalszej preparatyki porcji krwi nie przekraczał 12 godz.

Badanie liczby i żywotności komórek. Liczbę komórek określano w zawiesinie przy użyciu analizatora hematologicznego Sysmex 820 (Kobe). Odsetek komórek żywych badano po ich wyznakowaniu oranżem akrydyny i podbarwieniu bromkiem etydyny w mikroskopie fluorescencyjnym, analizując co najmniej 100 komórek o morfologii mononuklearów.

Izolacja komórek zawierających frakcję niekrwiotwórczych komórek macierzystych. Frakcja komórek jednojądrzastych pozyskiwana była metodą wirowania w gradiencie Ficoll/Uropolina (1,077 g/ml). Komórki o fenotypie CD34⁻ izolowane były metodą negatywnej selekcji populacji CD34⁺ przez jej adhezję w kolumnach magnetycznych (MiniMACS, Miltenyi Biotec) po wyznakowaniu immunosferami opłaszczonymi przeciwciałem anti-CD34. Frakcja komórek CD34⁺ była odrzucana albo przeznaczana do innych doświadczeń (próba indukcji plastyczności komórek). Komórki CD34⁻ były zawieszane w podłożu hodowlanym Dulbecco w modyfikacji Iscove'a (IMDM, Gibco) z dodatkiem surowicy płodowej cielęcej (FCS, Gibco) i doprowadzane do gęstości 10⁶/ml.

Hodowla frakcji komórek przylegających do plastyku. Zawiesinę komórek CD34⁻ umieszczano w 75 cm³ butelkach plastikowych (Falcon Plastics) i inkubowano w 37°C, 5% CO₂ przez 12 godz. Następnie podłoże z komórkami nieprzylegającymi przenoszono do nowych butelek (wariant II), butelki z komórkami przylegającymi (wariant I) uzupełniano IMDM z 20% FCS, obydwa warianty hodowli prowadzono w 37°C, w 5% CO₂. Wariant I hodowli prowadzono przez okres, w którym można było zaobserwować komórki przylegające do plastyku, wymieniając 1/2 objętości podłoża w odstępach tygodniowych. W wariantie II po 48 godz. hodowli znad komórek, które (uprzednio we frakcji nieprzylegającej) przyległy do plastyku, zlewano podłoże z zawieszonymi w nim nieprzylegającymi komórkami, butelki uzupełniano identycznym podłożem z surowicą i pozostawiano w hodowli na ok. 21 dni, wymieniając w odstępach tygodniowych 1/2 objętości podłoża znad komórek. Po tym okresie selekcionowano butelki, w których obserwowano wzrost hodowli do etapu pokrycia komórkami >70% powierzchni plastyku, trypsynizowano (0,25% trypsyny Gibco w PBS) i pasażowano w proporcji 1:3. Badanie potencjału neuropoetycznego uzyskanych komórek wykonane było zgodnie z publikacją Bużańskiej i wsp. [2] przez zespół CMDiK.

Stymulacja proliferacji prekursorów neurogenezy w populacji komórek CD34⁺. Komórki CD34⁺ zawieszane były w podłożu IMDM z 20% FCS i hodowane w

gęstości 5×10^4 /ml bez dodatków czynników wzrostowych lub z dodatkiem 10 ng/ml lub 25 ng/ml nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF). Hodowla prowadzona była w temp. 37°C przez czas, w którym obserwowano obecność komórek, których liczbę i żywotność oceniano w odstępach tygodniowych. W przypadku uzyskania efektu proliferacji komórek przylegających, podobnie jak w hodowli komórek CD34⁻ zakładano postępowanie zgodne z publikowanym w pracy [2].

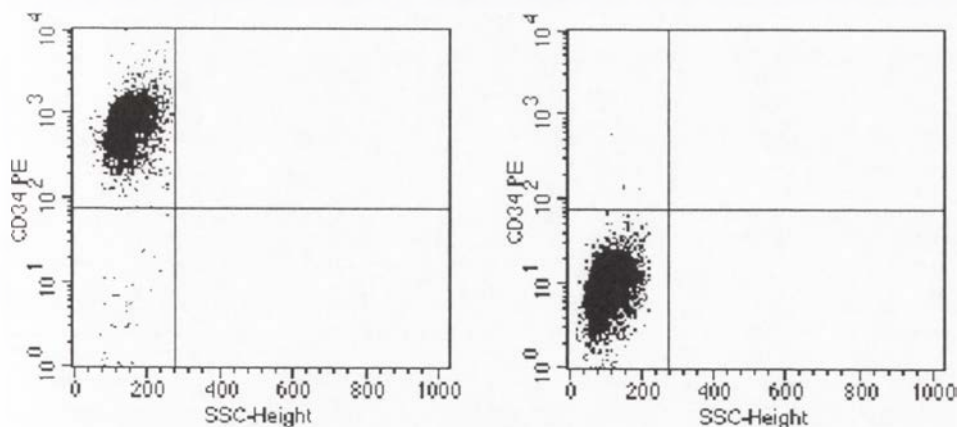
Stymulacja hodowanych komórek CD34⁻ w kierunku różnicowania w linie krwiotwórcze. Komórki wariantu II hodowli pozyskiwane metodą trypsynizacji po I pasażu zawieszane były w komercyjnych podłożach Methocult H 4330 (*Stem Cell Technologies*) w gęstości 5×10^4 /ml i inkubowane w temp. 37°C , 5% CO₂. Obserwowano liczbę kolonii komórkowych pojawiających się do 21 dnia hodowli. Jako kontrolę użyto hodowli w identycznych warunkach świeżej, nieseparowanej frakcji komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej oraz separowanych komórek CD34⁺.

Identyfikacja markerów powierzchniowych na hodowanych komórkach. Komórki w postaci zawiesiny, znakowane odpowiednio mysim przeciwciałem anti-CD34 HPCA2 (PE) i/lub anti-CD45 (FITC) (Becton Dickinson) analizowano przy użyciu cytometru przepływowego (FACSCalibur, Becton Dickinson) z oprogramowaniem CellQuest. Oceniano wielkości (FSC), ziarnistości (SSC) i wiązanie znakowanych fluorochromami przeciwciał.

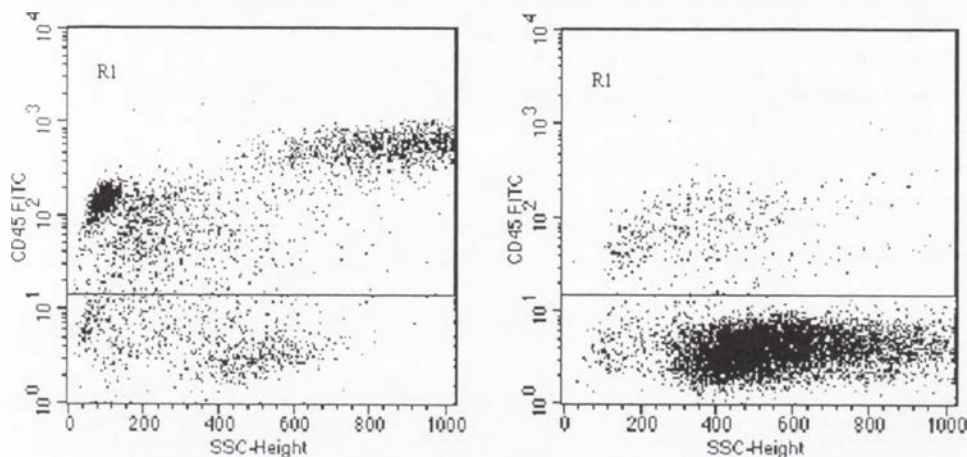
WYNIKI

Wstępny rozdział komórek jednojądrzastych na frakcję CD34⁺ i CD34⁻ (ryc. 1) miał na celu nie tylko wzbogacenie frakcji hodowanej w komórki o fenotypie zbliżonym do mezenchymalnej komórki macierzystej dorosłych, ale (co istotniejsze) uniknięcie stymulacji dojrzewania hodowanych komórek przez czynniki wzrostowe (cytokiny) wydzielane do podłoża przez komórki krwiotwórcze (CD34⁺).

Zastosowana metoda izolacji komórek krwi pępowinowej przylegających do plastyku pozwala w efekcie na pozyskanie metodą selekcji negatywnej (eliminacji) komórek nieprzylegających, nieproliferujących bez dodatku innych niż zawarte w surowicy płodowej czynników wzrostowych, na ich ekspansję do postaci komórek rosnących jednowarstwowo i hodowli co najmniej po jednokrotnym pasażowaniu. Wzrost komórek jest powolny, osiągnięcie etapu pojedynczej warstwy wymaga co najmniej 3 tygodni. Pierwsza frakcja komórek przylegających (12 godz. od momentu izolacji) prawie nigdy nie pozwala na ich ekspansję – dominują komórki nieproliferujące, o morfologii zbliżonej do makrofagów. Lepsze wyniki uzyskano inkubując frakcję komórek nieprzylegających do plastyku przez pierwsze 12 godz. inkubacji, a potem przenosząc do następnej butelki i pozostawiając na okres do 48 godz. Izolowane w ten sposób komórki przybierały kształty zbliżone do fibroblastów (fot. 1 a,b) i wykazywały zdolność do proliferacji. Wszystkie od początku nie miały na powierzchni antygeny CD34, natomiast antygen CD45, obecny na ok. 80% komórek na etapie rozpoczęcia hodowli, po 3–6 tygodniach wykrywalny był jedynie na ok. 6% komórek (ryc. 2). Komórki te [2] po dodaniu do



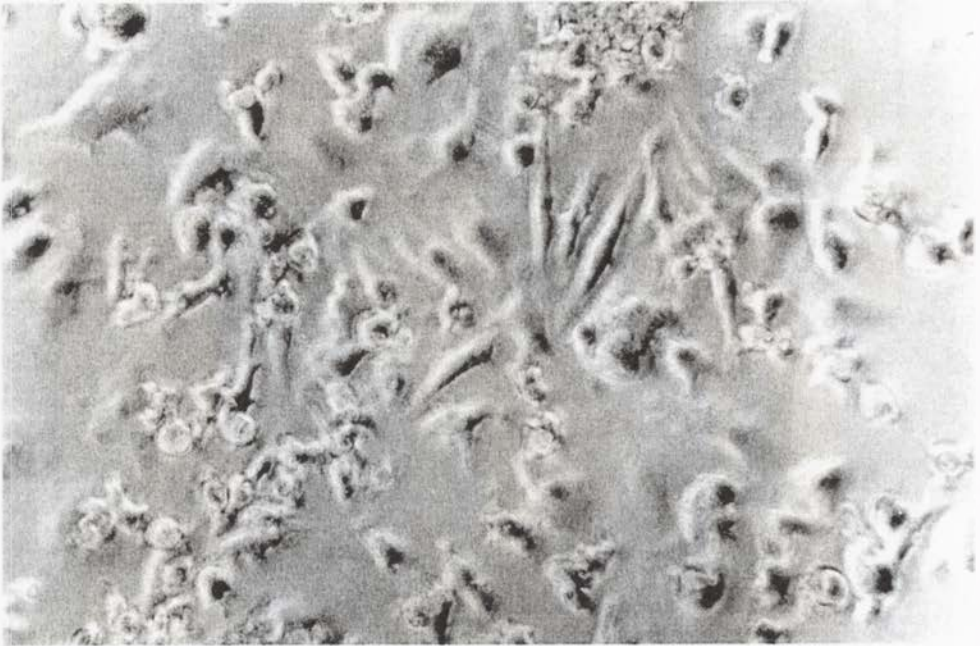
RYCINA 1. Wyniki rozdziálu komórek jednojądrzastych na frakcje CD34⁺ (lewe okno) i CD34⁻ (prawe okno) uzyskane w cytometrze przepływowym. Czystości populacji wynosiły odpowiednio: 96% dla frakcji CD34⁺ i 99,84% dla frakcji CD34⁻.



RYCINA 2. Częstości występowania antygenu CD45 na hodowanych komórkach przylegających do plastyku oznaczane cytometrią przepływową: okno lewe – komórki w pierwszym dniu hodowli, odsetek kom. CD45⁺ wynosi 83%, okno prawe – komórki po 6 tyg. hodowli, odsetek kom. CD45⁺ wynosi 6%

podłoża EGF przyspieszały tempo podziálu – na tym etapie czas od pasażu do stadium jednowarstwowej hodowli redukował się do ok. 7 dni. Praktycznie wszystkie komórki powstałe w trakcie hodowli z dodatkiem EGF wykazywały na powierzchni obecność markera *nestyny* swoistego dla wczesnych komórek linii neurogenezy [2].

Nie zdołano uzyskać powtarzalności procesu izolacji i ekspansji *in vitro* komórek przylegających CD34⁻ krwi pępowinowej. Do chwili obecnej częstość porcji krwi pępowinowej, z której udaje się wyprowadzić linię komórek przylegających do plastyku, zdolnych do proliferacji bez czynników wzrostowych w czasie pozwalającym na co

a**b**

FOTOGRAFIA 1. Komórki przylegające do plastyku (a) po 7 dniach i (b) po 6 tygodniach hodowli. Hodowla 6-tygodniowa prowadzona była bez pasażowania do nowej butelki hodowlanej

najmniej 2 pasaże, wynosi nie więcej niż 1, a 50 – zgodnie z ustnymi informacjami jest to sytuacja podobna jak obserwowana przez te zespoły, które w ogóle potrafią te komórki hodować. Sytuacja taka może wynikać albo z heterogenności pozyskiwanego materiału (różny wiek ciąży, a więc etap produkcji płodowych komórek macierzystych, różna intensywność zadziałania czynników odpowiedzialnych za wyrzut tych komórek do krwiobiegu w trakcie porodu itp.), albo z niedopasowania stosowanych metod hodowli do wymagań badanych komórek. Możliwość druga jest znacznie korzystniejsza dla przyszłych badań i aplikacji klinicznych – pozwala ona mieć nadzieję na uzyskanie lepszej powtarzalności procesu pozyskiwania i ekspansji komórek macierzystych krwi pępowinowej wraz z optymalizacją stosowanych metod.

Wstępnie rozdzielone subpopulacje komórek krwi pępowinowej zdolnych do produkcji albo komórek układu nerwowego (oligodendrocytów, neuronów i astrocytów [2]), albo komórek układu krwiotwórczego, różniły się fenotypem, wymaganiami hodowlanymi i tempem różnicowania. Populacja pierwsza nie wymagała dostarczania innych niż potencjalnie obecne w surowicy płodowej czynników wzrostowych przez co najmniej 3 tygodnie hodowli, rosła w postaci przylegającej do plastyku i przybierała fenotyp CD34⁻, CD45⁻. W odróżnieniu od niej, populacja komórek krwiotwórczych wymagała ciągłej obecności czynników wzrostowych (SCF, IL-3, GM-CSF, Epo), w hodowli płynnej (IMDM + FCS) lub półpłynnej (Methocult) ulegała szybkiemu różnicowaniu i dojrzewaniu do komórek docelowych, składała się z komórek o morfologii zbliżonej do limfocytu, nie wykazywała zdolności przylegania do plastyku i miała na powierzchni antygeny CD34 i CD45.

Podjęte próby indukowania transdyferencjacji (zgodnie z koncepcją plastyczności komórki macierzystej) neuralnych komórek macierzystych w linię hematopoezy lub odwrotnie, krwiotwórczych komórek macierzystych w linię neurogenezy, nie dały efektu [9] – komórki każdej z wymienionych populacji nie różnicowały się w kierunku innej niż „własna” linii i nie reagowały na specyficzne dla innych kierunków różnicowania czynniki wzrostowe.

PODSUMOWANIE

Obecność krwiotwórczych komórek macierzystych we krwi pępowinowej jest faktem od dawna uznanym, a ich przydatność kliniczna jako materiału do przeszczepów krwiotwórczych nie budzi wątpliwości i jest praktycznie zweryfikowana. Znacznie bardziej kontrowersyjny jest problem ewentualnej obecności i możliwości wykorzystania komórek zdolnych do wytwarzania innych tkanek. Potencjalnym odpowiednikiem komórek, których istnienie jest udowodnione lub postulowane w organizmach dorosłych, może być komórka o cechach mezenchymalnej komórki macierzystej, komórka krwiotwórcza o cechach „plastyczności” lub też inna, niewystępująca w dorosłym organizmie komórka macierzysta. Komórki krwi pępowinowej powstają w okresie życia płodowego, więc nie muszą być tożsame z ich odpowiednikami obecnymi w dorosłym organizmie. Dotychczas opisano istnienie komórek różnicujących się w jedną

tkankę (najczęściej komórki ośrodkowego układu nerwowego [2, 12]), wiele tkanek [3, 5, 6], niektórzy autorzy do chwili obecnej wątpią w istnienie jakichkolwiek komórek macierzystych o innych niż krwiotwórczy potencjałach różnicowania [7, 13]. Jedyną dotychczas pracą badającą cechy niekrwiotwórczej komórki krwi pępowinowej w układzie klonalnym (potomstwo pojedynczej komórki) jest wspomniana już praca Lee i wsp. [6], w której autorzy opisali komórkę zbliżoną fenotypem i zachowaniem *in vitro* do mezenchymalnej komórki macierzystej, ale prawdopodobnie obdarzoną szerszym spektrum kierunkowania w różne tkanki. Komórki o podobnej morfologii i typie wzrostu *in vitro* różnicowały się w naszych doświadczeniach w komórki układu nerwowego – na przeszkodzie szybkiemu badaniu ich innych właściwości stała niska częstość (1:50) porcji krwi pępowinowej, z których byliśmy w stanie pozyskać je i hodować. Na obecnym etapie nie można wykluczyć, że są to takie same komórki, jakie wyizolował i opisał zespół Lee i wsp. Aktualnie komórki separowane opisaną metodą są przez nas dostarczane zespołom kooperującym, które wykorzystują je m.in. do badania potencjału wytwórczego takich komórek i tkanek, takich jak: śródbłonek, mięsień prążkowany i komórki ośrodkowego układu nerwowego w układzie *in vivo* (na zwierzętach). Kompilacja wyników uzyskanych przez różne zespoły w trakcie badań z wykorzystaniem tych samych komórek wyjściowych powinna pozwolić na bardziej całościową interpretację danych dotyczących niekrwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej.

Zakres przyszłościowych zastosowań klinicznych komórek macierzystych krwi pępowinowej będzie zależał od liczby i rodzajów komórek możliwych do pozyskania, ewentualnej modyfikacji i wykorzystania w lecznictwie. Podobnie jak w przypadku komórek pozyskiwanych z innych źródeł, liczba komórek lub łatwość ich ekspansji *in vitro* muszą pozwolić na ich stosowanie przy zainwestowaniu racjonalnego czasu i akceptowalnych kosztów. Już obecnie można jednak wskazać dwie cechy, z racji których komórki krwi pępowinowej mają przewagę nad komórkami dorosłych. Pierwszą jest łatwość i brak przeciwwskazań ich pozyskania zarówno w układzie auto-, jak i allogenicznym – izolowane są z porcji krwi pozostającej w naczyniach krwionośnych łożyska i łożyskowej części pępowiny po urodzeniu dziecka – stąd stanowią „materiał odpadowy”. Drugą zaletą jest brak „cech starzenia genomu” – są to komórki płodowe w znikomym stopniu uszkodzane (w odróżnieniu od komórek dorosłych) promieniowaniem, mutagenami środowiskowymi, błędami replikacji DNA i defektami podziałowymi chromosomów, mające dłuższe telomery i aktywną telomerazę. Stąd też, oprócz potencjalnej przydatności dla zastosowań opartych na hodowli, modyfikacji lub kierunkowaniu różnicowania i dojrzewania, byłyby one znacznie przydatniejszym materiałem przy stosowaniu metod wymagających transferu jądra somatycznego (klonowanie terapeutyczne). Wszystkie te perspektywiczne zalety mogą być wykorzystane tylko pod warunkiem identyfikacji w krwi pępowinowej wystarczającej liczby odpowiednich komórek macierzystych z następowym opracowaniem wydajnych technik ich selekcji, ekspansji i modyfikacji *in vitro*.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARKER JN, WAGNER JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 526–532.
- [2] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [3] ERICES A, CONGET P, MINGUELL JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; **109**: 235–242.
- [4] GLUCKMAN E, BROXMEYER HA, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS, DOUGLAS GW, DEVERGIE A, ESPEROU H, THIERRY D, SOCIE G, LEHN P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; **321**: 1174–1178.
- [5] GOODWIN HS, BICKNESE AR, CHIEN SN, BOGUCKI BD, QUINN CO, WALL DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: Expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7**: 581–588.
- [6] LEE OK, KUO TK, CHEN W-M, LEE K-D, HSIEH S-L, CHEN T-H. Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, w druku.
- [7] MARESCHI K, BIASIN E, PIACIBELLO W, AGLIETTA M, MADON E, FAGIOLI F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; **86**: 1099–1100.
- [8] MUROHARA T, IKEDA H, DUAN J, SHINTANI S, SASAKI K, EGUCHI H, ONITSUKA I, MATSUI K, IMAIZUMI T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1527–1536.
- [9] POJDA Z, MACHAJ E, GAJKOWSKA A, OLDAK T. Hematopoietic and neuropoietic cord blood stem cells are supposedly two different cell populations – preliminary results. *The First Annual Stem Cell Wetlab/Conference*, 8–11.04. 2003, Providence, USA, streszczenie.
- [10] RAFF M. Adult stem cell plasticity: Fact or Artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 1–22.
- [11] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2003, w druku.
- [12] SANCHEZ-RAMOS JR, SONG S, KAMATH SG, ZIGOVA T, WILLING A, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORD T, CHOPP M, SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [13] WEXLER SA, DONALDSON C, DENNING-KENDALL P, RICE C, BRADLEY B, HOWS JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003; **121**: 368–374.
- [14] ZHANG XY, LA RUSSA VF, REISER J. Mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 2003; **229**: 131–140.

Adres autora: Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

WSTĘPNA OCENA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH POZYSKANYCH Z RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI PEPOWINOWEJ DO JEDNOCZESNEGO PRZESZCZEPIENIA U BIORCÓW DOROSŁYCH*

POSSIBILITY OF USE OF HEMATOPOIETIC CELLS COLLECTED
FROM DIFFERENT DONORS OF CORD BLOOD FOR SIMULTANEOUS
TRANSPLANTATION INTO ADULT RECIPIENTS. PRELIMINARY
EVALUATION

Wiesław WIKTOR-JĘDRZEJCZAK, Elżbieta URBANOWSKA, Małgorzata
ROKICKA, Małgorzata KRÓL, Maria KRÓL, Tigran TOROSJAN, Agnieszka
TOMASZEWSKA, Monika PALUSZEWSKA, Anna GRONKOWSKA

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Podstawową wadą krwi pępowinowej jako źródła komórek do przeszczepienia, jest niewielka liczba komórek, zwykle poniżej 1 miliarda, co umożliwia wykonanie zabiegu jedynie u dzieci poniżej 30 kg, podczas gdy większość biorców ma większą masę ciała. Stąd pomysł jednoczesnego wykorzystania kilku jednostek krwi pępowinowej, które łącznie mają zapewnić dostateczną liczbę komórek do przeszczepienia dorosłemu biorcy. Najważniejsze jest to, że komórki odpornościowe obecne we krwi pępowinowej, jako komórki młode nie powinny być zdolne do wzajemnej reakcji przeciwko sobie. Takie reakcje są największym zagrożeniem powodzenia pomysłu i dlatego w pierwszej kolejności zbadaliśmy, czy wspólna hodowla komórek krwiotwórczych z dwóch różnych jednostek krwi pępowinowej wiąże się z ich interakcją wpływającą na liczbę generowanych kolonii krwiotwórczych. Badania takie nie wykazały obecności różnic, jeśli chodzi o wartości średnie, ale obserwowano również wyniki przeciwstawne, tj. zarówno zahamowanie, jak i stymulację w poszczególnych kombinacjach. Wykonaliśmy też próbę kliniczną u dorosłego mężczyzny z ostrą białaczką szpikową bez remisji, któremu przeszczepiliśmy komórki z dwóch różnych jednostek krwi pępowinowej. Uzyskaliśmy udokumento-

* Praca jest sprawozdaniem z realizacji I etapu tematu pt.: „Ocena możliwości wykorzystania zmieszanych krwiotwórczych komórek macierzystych pozyskanych z różnych jednostek krwi pępowinowej (ZKP) do jednoczesnego przeszczepienia u biorców dorosłych.” Projektu Badawczego Zamawianego Nr PBZ-KBN-083/P05/2002.

wane wszczepienie jednej spośród tych dwóch jednostek i normalizację liczby granulocytów. Ogółem wyniki te sugerują, że badana metoda lecznicza rokuje na przyszłe rutynowe zastosowanie u biorców, którzy nie mają ani spokrewnionego, ani niespokrewnionego dawcy szpiku.

Słowa kluczowe: krew łożyskowa, przeszczepienie szpiku, hematopoeza.

Summary: Essential limitation to the use of cord blood as the source of cell for transplantation is limited cell number, usually below 1 billion, what allows for routine transplantation of only children weighting less than 30 kg, while majority of potential recipients possess higher body mass. This has led to an idea of simultaneous use of several units of cord blood, that combined would fulfill requirements for the necessary cell number for adult recipient. One of the potentially main obstacles is a possibility of mutual and negative interaction between cells derived from different units. Therefore, as the first issue we have tested whether simultaneous culture of mixed hematopoietic cells derived from different units would affect the number of hematopoietic colonies formed. We have not found any differences between mean values, but in particular pairs there were both inhibition and stimulation of colony formation when compared to theoretical, calculated values. Additionally, we have also performed a clinical attempt to simultaneously transplant adult man with acute myeloblastic leukemia utilizing two different cord blood units. Patient has become reconstituted with only one. Combined, these preliminary results may suggest that a method based on this principle may reach the routine application.

Key words: placental blood, bone marrow transplantation, hematopoiesis.

W ciągu 15 lat od podjęcia pierwszych prób klinicznych przeszczepianie komórek krwiotwórczych uzyskanych z krwi pępowinowej stało się cenną alternatywą dla przeszczepiania szpiku [1,3]. W porównaniu z tym ostatnim materiałem krwiotwórczym, krew pępowinowa ma wiele zalet, takich, jak natychmiastowa dostępność krwi zbankowanej oraz znaczna plastyczność w doborze w zakresie HLA, gdzie dopuszczalna jest nawet niezgodność trzech spośród 6 głównych antygenów w sytuacji, kiedy dawca i biorca są niespokrewnieni [12]. Największą wadą krwi pępowinowej jest to, że jest ona dostępna w ograniczonej ilości, z reguły nieprzekraczającej 100 ml, czyli miliarda komórek. Taka liczba komórek jest w stanie umożliwić bezpieczne przeszczepienie jedynie u biorcy poniżej 30 kg masy ciała, podczas, gdy większość potencjalnych biorców jest cięższa [4]. Z tego powodu od lat czynione są próby zwiększania liczby komórek we krwi pępowinowej metodami hodowli *in vitro*. Dotychczasowe wyniki tych prób są jednak umiarkowane [8]. Udaje się głównie zwiększyć liczbę prekursorów krwiotwórczych odpowiedzialnych za wstępną fazę wszczepienia. Chociaż skraca to okres pancytopenii po przeszczepieniu, to odbywa się kosztem ostatecznego wszczepienia. Dzieje się tak, dlatego że w dotychczasowych próbach ekspansji zwiększa się jedynie liczbę komórek pośrednich pomiędzy macierzystymi a końcowymi, co w gruncie rzeczy odbywa się kosztem faktycznego zmniejszenia liczby komórek macierzystych. Prawdziwym zaś celem ekspansji jest zwiększenie liczby komórek macierzystych. Tym niemniej próby pozaustrojowej ekspansji komórek macierzystych krwi pępowinowej podejmowane są przez różne zespoły w różnych wariantach metodycznych (z wykorzystaniem różnych cytokin), podścieliska krwiotwórczego, różnych pożywek itp. [2].

Nas zainteresował alternatywny pomysł mający na celu rozwiązanie problemu niedostatecznej liczby komórek krwiotwórczych w pojedynczej jednostce krwi pępowinowej, który zgłosiliśmy do finansowania wtedy, kiedy jeszcze nie było żadnych

prezentacji ani publikacji na ten temat. Pomysłem tym było jednoczesne przeszczepienie kilku jednostek pojedynczemu choremu. To, że dotychczas jest to niemal niezbadane zagadnienie, wynikało prawdopodobnie stąd, że na ogół sposób wykorzystania krwi pępowinowej powieli wcześniejsze osiągnięcia dotyczące przeszczepiania szpiku, a ponadto w przypadku szpiku nie istnieje problem istotnego niedoboru komórek do przeszczepienia, a oprócz tego szpik musi być przeszczepiony w warunkach całkowitej zgodności w HLA. Znalezienie dwóch niespokrewnionych dawców identycznych w HLA z biorcą jest bardzo rzadkie. W odniesieniu natomiast do komórek krwi pępowinowej, dla niemal każdego biorcy można znaleźć kilka jednostek zgodnych w zakresie czterech i więcej antygenów i w ten sposób „uzbierać” liczbę komórek niezbędną do bezpiecznego przeszczepienia. Słowo „bezpieczne” jest tu o tyle istotne, że w przypadku krwi pępowinowej opisywano udane przeszczepienie nawet po podaniu tylko 10 mln komórek/kg, ale dotyczyło to jednostkowych sytuacji. Zazwyczaj u większych biorców dochodzi do istotnego opóźnienia wszczepienia, powikłań i zgonów wynikających głównie z niedostatecznej liczby komórek. Ostatecznie tylko 18% zabiegów kończy się powodzeniem [3].

Chociaż pomysł przeszczepiania jednocześnie więcej niż jednej jednostki krwi pępowinowej nie był do tej pory systematycznie badany, to w dyskusji na zjazdach naukowych wspomniano o pojedynczym przypadku takiej próby. W tym przypadku, w którym pacjent przeżył przeszczepienie kilkunastu jednostek, podobno okazało się, że jest on zrekonstruowany potomstwem komórkowym tylko jednej z nich. Ponadto jeden przypadek opisali ostatnio Chińczycy [6]. Podobne wyniki przedstawili także Wagner i wsp. [5]. To obrazuje dwie teoretyczne możliwości przy powodzeniu takich prób:

- 1) biorca zostaje ostatecznie zrekonstruowany przez potomstwo komórek macierzystych pochodzących od różnych dawców,
- 2) po przeszczepieniu dochodzi do konkurencji komórek macierzystych i biorca zostaje zrekonstruowany tylko potomstwem jednej z nich: tej o największym potencjale proliferacyjnym.

Obrazuje to też możliwości niepowodzenia. Otóż komórki z poszczególnych jednostek mogą nie tylko oddziaływać z gospodarzem rekonstruując go lub nie, ale mogą też oddziaływać między sobą. W przeszłości, w odniesieniu do szpiku opisano zjawisko inaktywacji komórek macierzystych [10,11]. Polegało ono na tym, że w razie jednoczesnego przeszczepienia szpiku pochodzącego od różnych szczepów wsobnych myszy, obecne w tym szpiku komórki odpornościowe wzajemnie inaktywowały komórki macierzyste dawcy z innego szczepu. Jednakże zjawisko inaktywacji komórek macierzystych nie musi zachodzić w odniesieniu do krwi pępowinowej, która pochodzi od noworodków, a więc od ludzi ze słabo jeszcze rozwiniętym układem odpornościowym. Niewątpliwie przed rozpoczęciem bardziej systematycznych prób klinicznych powinno zostać wyjaśnione, czy istnieją też inne niebezpieczeństwa.

Najważniejsze etapy prac nad rozwojem proponowanej metody leczniczej to:

1. Zbadanie, czy zmieszane ze sobą komórki krwiotwórcze pochodzące z różnych jednostek krwi pępowinowej tworzą podobną, czy różną liczbę kolonii krwiotwórczych.

TABELA 1. Tworzenie kolonii przez komórki GM-CFU i CFU-GEMM pochodzące z dwóch zmieszanych ze sobą jednostek krwi pępowinowej

Numery jednostek Liczba par: 18	Teoretyczna liczba kolonii/10 ⁴ komórek	Doświadczalnie określona liczba kolonii/10 ⁴ komórek	Liczba różnic w zakresie antygenów HLA
88 + 89	18,9	14,8	3
88 + 117	31,4	26,6	3
89 + 117	19,5	29,9	4
4 + 50	24	24	nieznana
123 + 122	116,1	207,5	4
112 + 122	33,4	69,1	nieznana
112 + 123	109,2	102,5	nieznana
2 + 110	208	317,9	nieznana
51 + 14	191,9	230,6	2
106 + 37	93,4	252,2	nieznana
105 + 106	272	300,2	nieznana
105 + 37	208,6	550,2	nieznana
110 + 93	39,2	13,8	4
115 + 124	114,3	89,7	3
7 + 75	15,2	8	nieznana
135 + 42	52,1	40	nieznana
135 + 6	148	122,7	nieznana
6 + 42	157,5	132,7	nieznana
Średnia ± SD	102,9 ± 80	140,7 ± 145	nie dotyczy

- Zbadanie zdolności zmieszanych komórek krwiotwórczych pochodzących z różnych jednostek krwi pępowinowej do ustanowienia ludzkiej hematopoezy u myszy SCID.
- Podjęcie prób klinicznych przeszczepiania zmieszanych jednostek krwi pępowinowej u ludzi.

W pierwszym etapie badań zajęliśmy się pierwszym i trzecim kierunkiem i poniżej przedstawiamy ich dotychczasowe wyniki.

Zbadanie, czy zmieszane ze sobą komórki krwiotwórcze pochodzące z różnych jednostek krwi pępowinowej tworzą podobną, czy różną liczbę kolonii krwiotwórczych

Przedmiotem badania były te jednostki krwi pępowinowej zgromadzone w naszym Banku Komórek Krwiotwórczych, dla których dysponowaliśmy dodatkowymi próbkami. Jednostki w naszym Banku po opracowaniu otrzymują swój unikalny numer i pod tym numerem są również wymienione w obecnej pracy. Zostały one pobrane i opracowane z wykorzystaniem standardowej metodologii dla tego typu czynności zgodnej ze standardami Eurocord.

Metoda hodowli kolonii krwiotwórczych jest znana i była przez nas kilkakrotnie opisywana. W obecnych badaniach zastosowaliśmy ją w wersji standardowej przy wykorzystaniu zestawów dostępnych w handlu (StemCells, Vancouver) po to, aby wyniki mogły być porównywane z danymi innych Autorów [9]. Doświadczenia polegają na określeniu liczby kolonii krwiotwórczych tworzonych przez zdefiniowaną liczbę komórek każdej spośród badanych jednostek krwi pępowinowej, a następnie określenia liczby kolonii krwiotwórczych tworzonych po zmieszaniu. Wszystkie podane liczby są średnimi z 3 niezależnych hodowli dla każdej kombinacji. W pierwszej kolejności omawiamy wyniki badań hodowli *in vitro* zmieszanych komórek pochodzących z różnych jednostek krwi pępowinowej. Wyniki badań hodowli GM-CFU i CFU-GEMM są podane w tabeli 1, a wyniki badań BFU-E w tabeli 2. W tabelach tych zestawiono liczby kolonii uzyskanych ze zsumowania liczb kolonii tworzonych przez komórki każdej z badanych jednostek krwi pępowinowej hodowanych oddzielnie z liczbami kolonii tworzonych przez komórki tych samych jednostek zmieszane ze sobą. Jak wynika z danych w tych tabelach, liczby te cechowały się dużą różnorodnością, ale zwykle liczby teoretyczne i praktyczne dla każdej pary były dość zbliżone, a wartości średnie nie wykazały istotnych różnic. Dla 6 spośród 18 porównywanych par jednostek krwi pępowinowej dysponowaliśmy oznaczeniem antygenów HLA. Pomiedzy komórkami istniały tu różnice od 2 do 4 spośród 6 badanych antygenów HLA. Podobnie jak dla

TABELA 2. Tworzenie kolonii przez komórki BFU-E pochodzące z dwóch mieszanych ze sobą jednostek krwi pępowinowej

Numery jednostek Liczba par: 18	Teoretyczna liczba kolonii/10 ⁴ komórek	Doświadczalnie określona liczba kolonii/10 ⁴ komórek	Liczba różnic w zakresie antygenów HLA
88 + 89	36	23	3
88 + 117	40,8	12,4	3
9 + 117	15,2	20,6	4
4 + 50	36,6	35,2	Nieznana
123 + 122	113,3	225,2	4
112 + 122	17,6	55,7	Nieznana
112 + 123	104,4	128,8	Nieznana
2 + 110	273,6	360,4	Nieznana
51 + 14	188,8	265,4	2
106 + 37	226,8	390,0	Nieznana
105 + 106	645	760,2	Nieznana
105 + 37	510	493	Nieznana
110 + 93	45	16	4
115 + 124	171	92	3
7 + 75	30,8	14	Nieznana
135 + 42	59	79	Nieznana
135 + 6	203,3	173,5	Nieznana
6 + 42	230,1	169,1	Nieznana
Średnia ± SD	176,4 ± 168,2	185,7 ± 209,4	Nie dotyczy

TABELA 3. Tworzenie kolonii przez komórki BFU-E pochodzące z dwóch zmieszanych ze sobą jednostek krwi pępowinowej bez uprzedniej wspólnej inkubacji i po 1 godzinie inkubacji.

Numery jednostek Liczba par: 6	Teoretyczna liczba kolonii/10 ⁴ komórek	Doświadczalnie określona liczba kolonii/10 ⁴ komórek bez preinkubacji	Doświadczalnie określona liczba komórek po godzinie inkubacji
126 + 131	81	68,8	128
126 + 132	110,3	136,6	79,1
126 + 133	99,4	28	33,8
131 + 132	180,1	220,3	250,5
131 + 133	169,6	156,2	138,6
132 + 133	198,6	187,5	162
Średnia ± SD	139,8 ± 48,8	132,9 ± 72,5	132 ± 74,1

całej analizowanej grupy nie obserwowaliśmy istotnych różnic między wartościami teoretycznymi uzyskanymi ze zsumowania oraz wartościami uzyskanymi z hodowli komórek zmieszanych. Ze względu na to, że w interesującej nas sytuacji jednoczesnego przeszczepiania komórek z dwóch lub więcej jednostek krwi pępowinowej nie wykorzystuje się komórek świeżo pobranych, lecz komórki zamrożone, postanowiliśmy zbadać również tę sytuację. Istniała bowiem możliwość, że proces zamrażania i rozmrażania komórek krwi pępowinowej może zmienić ich odczynowość. Dodatkowo postanowiliśmy zbadać, czy do takich interakcji nie dochodzi po godzinnej inkubacji komórek przed ich wysianiem do naczyń hodowlanych. Wyniki podane są w tabeli 3. Wprawdzie to doświadczenie było na razie ograniczone do 6 kombinacji, ale również tutaj nie stwierdziliśmy istnienia istotnych interakcji pomiędzy zmieszanyimi komórkami i uzyskane wyniki były zbliżone do uzyskanych z prostego zsumowania liczb kolonii uzyskanych w hodowlach oddzielnych.

Podjęcie prób klinicznych przeszczepiania zmieszanych jednostek krwi pępowinowej u ludzi

Chorzy, którym proponowane jest poddanie się doświadczalnym zabiegom przeszczepienia ZKP, są wybierani spośród pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie, jeśli spełniają następujące kryteria:

1. Mają wskazania do leczenia przeszczepieniem allogenicznych komórek krwiotwórczych zgodnie z Tabelą Wskazań EBMT [7].
2. Nie mają rodzinnego dawcy szpiku ani niespokrewnionego dawcy szpiku w rejestrach światowych.
3. Dysponują w Banku Komórek Krwiotwórczych Katedry Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie oraz w innych światowych bankach krwi pępowinowej wystarczającą liczbą jednostek krwi pępowinowej, aby zapewnić minimalnie wystarczającą liczbę komórek do wykonania zabiegu.

4. Są w stanie ogólnym dającym szansę na przeżycie 6 tygodni po przeszczepieniu, które są niezbędne do wszczepienia komórek krwi pępowinowej u człowieka.

Do dalszych badań kwalifikowani są wyłącznie chorzy, którzy wyrażą świadomą zgodę zgodnie z wymogami Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Warszawie.

Projekt ma za zadanie rozwiązać bardzo poważny problem, jakim jest ograniczenie możliwości wykorzystania komórek macierzystych uzyskanych z krwi pępowinowej jedynie do chorych o masie poniżej 30 kg. Ponieważ tacy chorzy stanowią mniej niż kilka procent wszystkich chorych wymagających przeszczepienia, pozytywne wyniki realizacji projektu mają znaczenie dla pozostałej większości.

Trzeba tu zaznaczyć, że chorzy spełniający powyższe kryteria obecnie nie mają innych opcji leczniczych i otrzymują jedynie leczenie objawowe czekając na śmierć.

Krytyczną sprawą jest dobranie każdemu kandydatowi odpowiedniej liczby jednostek krwi pępowinowej i dokładne wytestowanie ich po względem antygenowym.

W 2003 roku takie postępowanie udało się zakończyć w odniesieniu do jednego chorego, u którego wykonano przeszczepienie dwóch jednostek krwi pępowinowej 16.05.2003 roku. Poniżej przedstawiamy krótki opis tego przypadku.

Mężczyzna 21-letni przyjęty został w październiku 2002 r. do Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie z podejrzeniem ostrej białaczki. U chorego rozpoznano ostrą białaczkę szpikową mielomonoblastyczną (M4, wg FAB) i podano chemioterapię indukcyjną wg protokołu PALG-2002. U chorego nie uzyskano remisji całkowitej mimo podania trzech kursów indukcyjnych, a w mielogramie stwierdzono 60% komórek blastycznych.

Chory nie miał rodzinnego dawcy komórek krwiotwórczych, nie udało się również dobrać niespokrewnionego dawcy szpiku w rejestrach krajowych i międzynarodowych. Jednocześnie stwierdzono, że chory ma trzy częściowo zgodne (4/6 antygenów) jednostki krwi pępowinowej w naszym własnym Banku Komórek Krwiotwórczych, z których jedna zawierała jednak bardzo mało komórek i ją ostatecznie zdyskwalifikowano od przeszczepienia.

Chorego kondycjonowano skojarzeniem busulfanu (16 mg/kg), cyklofosfamidu (200 mg/kg) i tymoglobuliny. Tę ostatnią zastosowano w dawce 3,75 mg/kg w dniach: - 4, -3 oraz w dniach: +7, +9, +11, w dawce 1,25 mg/kg we wlewach dożylnych. Ponadto chory otrzymywał cyklosporynę A początkowo dożylnie 5 mg/kg w dobie -1, a następnie w dawce 3 mg/kg w dobie 0, ustalając następnie dawkę empiryczną potrzebną do utrzymania stężenia we krwi na poziomie 200–300 µg/ml. W dalszej kolejności chory otrzymywał lek doustnie.

W dniu 16.05.2003 podano dwie jednostki krioprezerwowanej krwi pępowinowej, z których jedna różniła się z biorcą w 1/6 antygenów HLA, a druga – w 2/6. Między sobą jednostki różniły się w 2/6 antygenów. Ponadto między biorcą a dawcami, a także między samymi dawcami istniała różnica dużych grup krwi.

Całkowita liczba przeszczepionych komórek jądrzastych wynosiła $2,2 \times 10^7$ /kg m.c. biorcy, a komórek CD34 $0,5 \times 10^7$ /kg m.c. biorcy. Łączna liczba przeszczepionych prekursorowych komórek krwiotwórczych, tworzących kolonie erytroidalne wynosiła $2,2 \times 10^4$ /kg m.c. biorcy, a liczba komórek prekursorowych tworzących kolonie granulocytarno-makrofagowe wynosiła

2,25 x 10⁴/kg m.c. biorcy. Pierwszego dnia po zabiegu chory otrzymywał dawkę 20 mg metotreksatu, a następnie w dniach +3, +6, +11 – 15 mg leku.

Pierwsze cechy przyjęcia się przeszczepów zaobserwowano w +32 dobie po zabiegu, kiedy stwierdzono po raz pierwszy pojawienie się neutrofilów we krwi obwodowej. Liczba ta systematycznie zwiększała się i w badaniu cytologicznym wykonanym w setnej dobie po przeszczepieniu stwierdzono bogatokomórkowy i prawidłowy cytologicznie szpik. Wykonane badania HLA wskazały, że rekonstrukcja krwiotworzenia wywodzi się tylko z jednej z przeszczepionych jednostek (UCBU 51).

W okresie poprzyszczepowym zanotowano u chorego liczne zakażenia zarówno bakteryjne, jak i grzybicze, które były leczone empirycznie i po uzyskaniu antybiogramu zgodnie z wynikami tych badań. Dwa miesiące po zabiegu u chorego rozpoznano kropidlakowe zapalenie płuc, a w ostatnim okresie życia około 95 doby – kropidlakowe zakażenie ośrodkowego układu nerwowego.

Drugim powikłaniem, które w znacznym stopniu wpłynęło na przebieg po zabiegu, było krwotoczne zapalenie pęcherza, które wystąpiło w dobie +18. Objawy schorzenia nie ustępowały prawie przez cały czas pobytu chorego w klinice pomimo intensywnego leczenia: płukania pęcherza moczowego *Argentum nitricum*, prostaglandyną alfa oraz trzykrotnej formalinizacji pęcherza moczowego przeprowadzonego w Klinice Urologii CMKP w Warszawie. Dopiero to ostatnie postępowanie doprowadziło do ustępowania objawów w okresie dwu ostatnich tygodni przed śmiercią chorego.

Opisany przypadek jest pierwszym tego typu w Polsce i jednym z pierwszych na świecie. Chociaż zakończył się on ostatecznie niepowodzeniem, to udowodnił, że tego typu zabieg jest wykonalny i że komórki krwiotwórcze krwi pępowinowej mogą zrekonstruować krwiotworzenie u dorosłego biorcy. Co więcej, mimo że zabieg wykonano u chorego bez remisji ostrej białaczki, do czasu zgonu nie zaobserwowano żadnych cech jej nawrotu. Nie wystąpiły także istotne cechy choroby: przeszczep przeciw gospodarzowi. Z drugiej strony, u chorego wystąpiły liczne powikłania infekcyjne, co należy przynajmniej częściowo wiązać z tym, że przyjmowanie się przeszczepu krwi pępowinowej następuje znacznie później niż przyjmowanie się przeszczepu szpiku czy komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej. Z drugiej strony na podatność chorego na te zakażenia musiał wpłynąć także fakt, że był on przeszczepiany bez remisji, a więc wyjściowo był w gorszym stanie niż normalnie chorzy poddawani przeszczepieniom od dawców niespokrewnionych. Trzecim czynnikiem, który bardzo zaważył na przebiegu poprzyszczepowym, było krwotoczne zapalenie pęcherza, którego wystąpienie trudno wiązać z rodzajem przebytego zabiegu, a raczej na jego wystąpienie wpłynęło uszkodzenie pęcherza pod wpływem chemioterapii z zastosowaniem cyklofosfamidu.

Podsumowując, dotychczas wykonane badania *in vitro* wskazują, że pomiędzy komórkami krwiotwórczymi uzyskanymi z krwi pępowinowej różnych dawców nie zachodzą istotne interakcje prowadzące do ich wzajemnej inaktywacji. Raczej, potencjał krwiotwórczy się sumuje. Wykonana próba kliniczna z kolei sugeruje, że komórki krwiotwórcze poszczególnych ludzi bardzo różnią się zdolnością do szybkiej repopulacji krwiotworzenia i w sytuacji, w której one się wzajemnie nie inaktywują, dochodzi

najprawdopodobniej do konkurencji i biorca zostaje skutecznie zrepopulowany przez komórki krwiotwórcze o największym potencjale proliferacyjnym. Oznacza to więc, że przeszczepianie komórek z więcej niż jednej jednostki krwi pępowinowej jedynie zwiększa szansę chorego na przeszczepienie komórek o tak dużym potencjale krwiotwórczym, że zdążą one odtworzyć mu układ krwiotwórczy w krótszym czasie, a więc zmniejszą ryzyko powikłań infekcyjnych i tym samym ryzyko zgonu.

LITERATURA

- [1] COHENA Y, NAGLER A. Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leuk Lymphoma* 2003; **44**: 1287–1299.
- [2] DEVINE SM, LAZARUS HM, EMERSON SG. Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant* 2003; **31**: 241–252.
- [3] GLUCKMAN E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000; **28**: 1197–1205.
- [4] GLUCKMAN E, ROCHA V, BOYER-CHAMMARD A i wsp. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997; **337**: 373–381.
- [5] GREWAL SS, BARKER JN, DAVIES SM, WAGNER JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood. *Blood* 2003; **101**: 4233–4244.
- [6] HE JS, HUANG H, CAI Z, LI L, YE XJ, ZHANG J, HU XR, JIN AY, LIN M. Treatment of one case of adult chronic myelogenous leukemia by two units of unrelated umbilical cord blood transplantation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2003; **5**: 508–511.
- [7] JĘDRZEJCZAK WW: Wskazania do przeszczepiania komórek krwiotwórczych według zaleceń Europejskiej Grupy do Spraw Przeszczepiania Krwi i Szpiku. W: Jędrzejczak WW, Podolak-Dawidziak M (red.) Standardy w hematologii. Volumed, 2000: 165–168.
- [8] KOGLER G, NURNBERGER W, FISCHER J i wsp. Simultaneous cord blood transplantation of *ex vivo* expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1999; **24**: 397–403.
- [9] MIGLIACCIO AR, ADAMSON JW., STEVENS CE i wsp. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000; **96**: 2717–2722.
- [10] PETROV RV, MANYKO VM, PANTELEYEV EI, SESLAVINA LS. Inactivation of stem cells after transplantation of mixtures of haemopoietic or lymphoid cells of different genotypes. *Transplantation* 1969; **7**: 165–175.
- [11] PETROV RV, SESLAVINA LS, PANTELJEV EI. Stem cell inactivation in mixed spleen cell cultures. *Nature* 1968; **217**: 558–560.
- [12] RUBINSTEIN P, CARRIER C, SCARADAVOU M i wsp. Outcome among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1565–1577.

Adres autorów: Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM,
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

Dodatkowe informacje dla Autorów

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik w 2003 r.

	odbitki prac dla Autorów				barwne rysunki i zdjęcia	dotatkowe strony
Liczba odbitek	50	100	200	400	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	200,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2003 i 2004

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2004 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 201240105311110-00004-409-533.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003 i na rok 2004
dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,
dla odbiorców indywidualnych 40 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2004

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa, No 201240105311110-00004-409-533.

Price per year 25 dollars USA or 21 €.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 148) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] *Histone and Nucleohistones*. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Barwne ryciny i zdjęcia są płatne. Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczony z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmiennionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel

Treść pracy nie była uprzednio publikowana,

i rycin

tak nie

nie została wysłana do innej redakcji

tak nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę

tak nie

Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z

Jest zgodna osoba, których informacje nie-

tak nie

podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego

publikowane są zamieszczone w tekście

tak nie

z komputera IBM

tak nie

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie tak nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postępie Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENT

Od redakcji	2
KUCIA M., MAJKA M, RATAJCZAK M Z. Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych: Fakt czy artefakt? – Phenomenon of tissue-specific stem cell plasticity	3
MAJKA M., MICHAŁOWSKA A., KUCIA M., RATAJCZAK M.Z.: Próba izolacji ludzkich komórek macierzystych mięśni szkieletowych – Isolation of human skeletal muscle stem cells	17
DUŚ D., PAPROCKA M.: Komórki progenitorowe śródbłonek: pochodzenie, charakterystyka i perspektywy wykorzystania w terapii Endothelial progenitor cells: origin, characteristics and their future therapeutic use	25
DRUKAŁA J., MAJKA M. RATAJCZAK M. Z.: Postępy w metodach izolacji i namnażania komórek macierzystych naskórka ludzkiego Advances in methods of isolation and expansion of human epidermal stem cells	37
GRABOWSKA I., STREMIŃSKA W., MORACZEWSKI J., MACHAJ K., WASILEWSKA D., KAWIAK J.: Ocena udziału komórek macierzystych człowieka w regeneracji mięśnia szkieletowego – badania na modelu mysim Participation of human stem cells in regeneration of skeletal muscles – the mouse model	49
BANY-ŁASZEWICZ U., KLIMCZAK-JAJOR E., PAŁYNYCZKO G., KOŚCIELAK J., KAMIŃSKA J.: Ocena dojrzewania komórek progenitorowych megakariocytów w hodowli <i>in vitro</i> komórek macierzystych hematopoezy Characteristic of maturation of megakaryocyte progenitor cells in <i>in vitro</i> culture of hematopoietic stem cells	61
KAMIŃSKA B.: Komórki macierzyste jako narzędzie terapeutyczne w schorzeniach neurologicznych Stem cells in therapy of neurologic disorders	73
MACHALIŃSKI B.: Optymalizacja techniki pozyskiwania komórek krwiotwórczych od heparynizowanych dawców narządów (HDN) An optimization of isolation of early hematopoietic cells from heparinized cadaveric organ donors (HCOD)	85
RELIGA P., BOJAKOWSKI K., GACIONG Z. Badania nad pochodzeniem miocytów błony wewnętrznej w przeszczepie aorty allogenicznej u szczura Origin of vascular smooth muscle cells in aortic allograft in the rat	97
STEC M., JAROCHA D., ZEMBALA M.: Optymalizacja metod izolacji i ekspansji komórek CD 34 ⁺ krwi pępowinowej Optimalization of the methods of CD 34 ⁺ cord blood cells isolation and expansion	103
WOJTOWICZ A., CHABEREK S., KISŁOWSKA-SYRYCZYŃSKA M., URBANOWSKA E., WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W., OSTROWSKI K.: Augmentacja tkanki kostnej szczęk przy wykorzystaniu autologicznego szpiku, krwiotwórczych komórek macierzystych oraz koncentratu krwinek płytkowych: analiza fraktalna obrazów rtg Maxillary bone augmentation using autologic bone marrow, hemopoietic stem cells and platelet rich plasma: fractal analysis of radiograms	115
POJDA Z., MACHAJ E. K, GAJKOWSKA A., OŁDAK T., JASTRZEWSKA M.: Badanie potencjalnej przydatności klinicznej komórek macierzystych uzyskiwanych z krwi pępowinowej Research on the potential clinical usefulness of stem cells collected from the cord blood	127
WIKTOR-JĘDRZEJCZAK 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 Possibility of use of hematopoietic cells collected from different donors of cord blood for simultaneous transplantation into adult recipients. preliminary evaluation	139
Dodatkowe wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	148