



SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW
KOMÓRKOWYCH
XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN
Mogilany 2004
pod redakcją Ireny Nalepy
137–145



Prof. dr hab. med. KRYSZYNA DOMAŃSKA-JANIK
Zespół Neurobiologii Naprawczej,
Instytut Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN
ul Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
tel. (+48)(22) 608-65-10
e-mail: kd-j@cmdik.pan.pl

KOMÓRKI MACIERZyste – POTENCJALNE ZASTOSOWANIE TERAPEUTYCZNE

KRYSZYNA DOMAŃSKA-JANIK

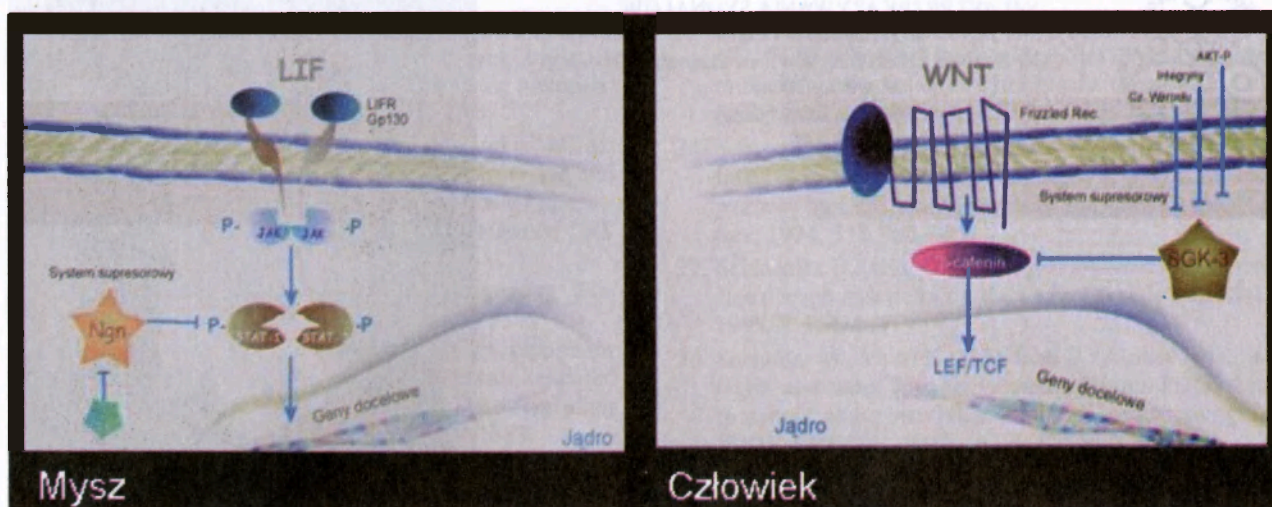
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

Możliwość wspomagania regeneracji nieodwracalnie uszkodzonych tkanek za pomocą przeszczepów ludzkich komórek macierzystych (KM) pojawiła się z chwilą znalezienia sposobu ich otrzymywania i długotrwałej hodowli z komórek wężła zarodkowego [41]. Są to tzw. embrionalne KM (eKM) różniące się teoretycznie do wszystkich typów komórek somatycznych. Pierwsze ich linie wyprowadzone przez autora są do dziś używane w wielu ośrodkach badawczych. Prawie jednocześnie pojawiły się doniesienia o możliwościach otrzymywania szerokiego wachlarza ukierunkowanych tkankowo KM występujących we wszystkich narządach na etapie rozwoju płodowego, a w ograniczonej ilości również w organizmach dojrzałych (tzw. somatyczne – sKM). Co ciekawe, nawet tkanki nie regenerujące w normalnych warunkach lub wykazujące jedynie ograniczoną zdolność do pro-

dukcji nowych komórek (np. mózg), posiadają endogenne zasoby sKM dające się stymulować do podziałów w określonych warunkach *in vivo* oraz izolować i namnażać *in vitro*.

Zgodnie z przyjętym schematem ontogenezy (Ryc. 1) KM mogą występować na 3 odrębnych szczeblach ograniczeń repertuaru różnicowania:

— totipotencjalne, różniące się bez ograniczeń do wszystkich tkanek i komórek organizmu. Do nich zaliczamy jedynie zapłodnione komórki jajowe oraz zarodki otrzymane w wyniku transferu jąder komórek somatycznych (SCNT). W przypadku zarodków ludzkich do niedawna tylko ta pierwsza możliwość była praktycznie osiągalna. W lutym br. ukazała się praca dokumentująca pierwszy pozytywny eksperyment otrzymania ludzkich blastocyst metodą SCNT i wyprowadzenia z nich 1 linii eKM [11];



Ryc. 1. Schematycznie przedstawione szlaki sygnałowe odpowiedzialne za utrzymywanie stałej, symetrycznej proliferacji (samopowielania się) komórek macierzystych. U myszy i innych gryzoni notuje się przewagę sygnału zależnego od LIF, natomiast u człowieka – zależnego od Wnt/β-catenina

- pluripotencjalne, mogące wytworzyć wszystkie linie komórek somatycznych (z wykluczeniem linii komórek płciowych, ang. *germ-line*). Ich odpowiednikiem hodowlanym są wspomniane już eKM – otrzymywane z węzła zarodkowego blastocysty;
- multipotencjalne, o jeszcze bardziej restrykcyjnym różnicowaniu jedynie do komórek sKM charakterystycznych dla danej tkanki pochodzącej z odpowiedniego listka zarodkowego. W organizmie występują one w swoistych niszach określonych tkanek czy narządów, niestety o bardzo zróżnicowanej ekspansywności i dostępności praktycznej. Sposobem na rozwiązanie tego problemu jest zmiana naturalnego losu łatwo dostępnych KM (*transdiferencjacja*), uzyskiwana przeważnie pod presją środowiskową *in vitro*.

Niezależnie od różnego stopnia ograniczenia potencjału różnicowania na poszczególnych etapach rozwojowych, wszystkie KM posiadają *per definitionem* wyróżniające je cechy wspólne. Do najbardziej podstawowych należy **zdolność do nieograniczonej samoodnowy** (ang. *self-renewal*) oparta na występowaniu symetrycznych bądź asymetrycznych podziałów komórkowych. Odpowiednikiem funkcjonalnym tej cechy KM jest ich klonogenność, która może być obserwowana zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Łatwo można sobie wyobrazić, że właśnie z nią związana jest zdolność KM do rozwojowej organogenezy jak i terapeutycznej repopulacji (regeneracji) uszkodzonych tkanek (np. krwiotwórczej w przeszczepach szpiku) i narządów. Drugą ważną cechą KM, równie istotną funkcjonalnie lecz stwarzającą najwięcej problemów praktycznych, jest utrzymanie specyficznej i kontrolowanej linii ich różnicowania do określonych typów komórek potomnych. Zrozu-

mienie podstaw molekularnych obu tych procesów określających i determinujących funkcjonalnie KM jest w stadium początkowym, a kontrowersje dotyczą nawet tego czy jest to proces rzeczywiście predeterminowany programem genetycznym, czy też, znajdując się jedynie pod silną presją czynników środowiskowych (epigenetycznych) występujących w rozwijającym się organizmie, posiada w zasadzie charakter stochastyczny. Z nieznanymi mechanizmami leżącymi u podstaw kontroli procesów proliferacji i różnicowania się KM wynikają ciągle nierozwiązane trudności metodyczne i praktyczne takie jak konieczność współhodowli eKM z tzw. komórkami odżywiającymi pochodzenia mysiego (*feeder layer*), słaba powtarzalność wyników osiąganych przez różne, a często nawet te same grupy badawcze, brak wystandaryzowanych metod izolacji czystej populacji KM oraz trudności uzyskania i utrzymania określonych linii hodowlanych, szczególnie w przypadku sKM. Nawet w ekspansywnie rosnących hodowlach nieodróżniane komórki samoodnawiające się występują jedynie na poziomie kilku procent i ciągle brak jest specyficznych markerów powierzchniowych pozwalających na ich selekcję, izolację i genotypowanie. Ustalenie podstawowych metod izolacji i hodowli KM u gryzoni bazujące na fenomenologicznej metodzie „prób i błędów” zajęło badaczom ponad 20 lat. Niestety, metody te nie sprawdzają się w przypadku ludzkich KM.

Fizjologicznie sKM w większości tkanek występują w podstawowym stanie tzw. „uśpiania” w swoich naturalnych niszach tkankowych i w bardzo małych ilościach. Jedynie pod wpływem stymulacji środowiskowej mogą przechodzić w fazę przyspieszonych podziałów (głównie asymetrycznych), generując komórki potomne. W warunkach sprzy-

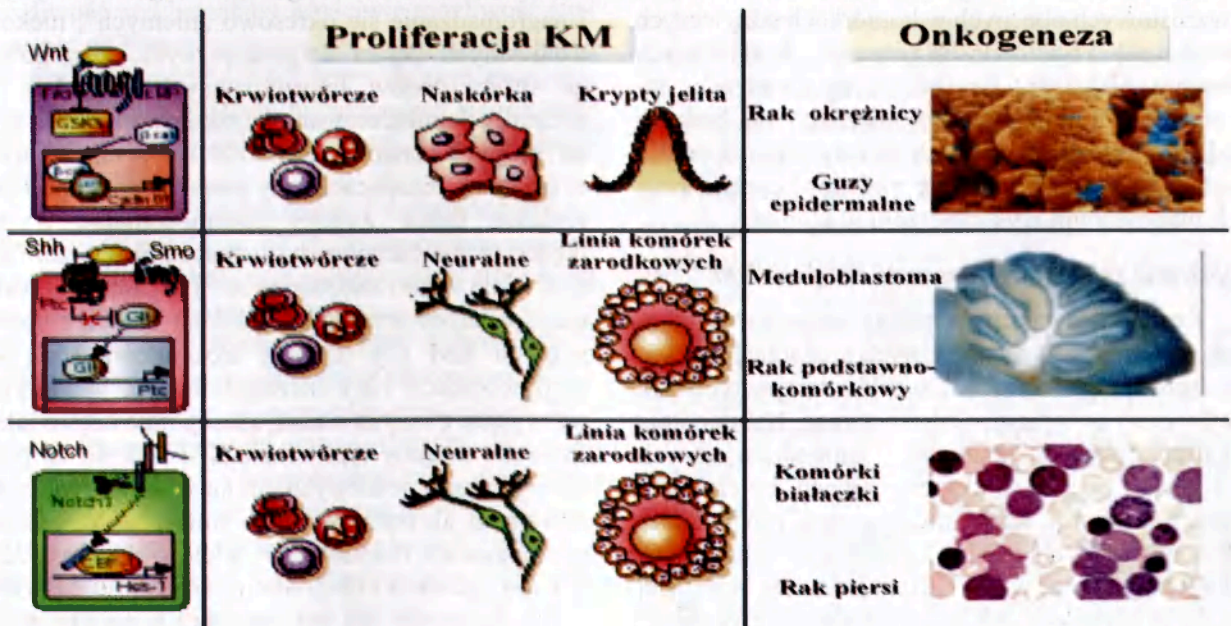
jających różnicowaniu mogą również, co stanowi duży problem w utrzymaniu stałych linii KM *in vitro*, samorzutnie przechodzić na następne poziomy różnicowania już w kierunku mono-potencjalnych, częściowo zróżnicowanych, dzielących się komórek prekursorowych.

Poznane mechanizmy molekularne utrzymujące KM w stanie niezróżnicowanym

W chwili obecnej poznane są dwie drogi sygnałowe zaangażowane w utrzymanie proliferacji (samodnowy) niezróżnicowanych, ludzkich KM *in vitro*, zarówno na poziomie komórek embrionalnych jak i somatycznych. Podstawowymi zewnątrzkomórkowymi ligandami działającymi auto- lub parakrynnie są cytokiny: Lif (*leukemia inhibitory factor*) [37, 46] i Wnt (*wingless*) [36]. Przedstawiony uproszczony schemat (Ryc. 1) przekazywania obu sygnałów w komórkach progenitorowych oparty jest na ogólnodostępnych diagramach (STKE Connections Map ><http://stke.sciencemag.org/cm><) aczkolwiek, szczególnie w odniesieniu do ludzkich KM, poszczególne elementy tych dróg są ciągle modyfikowane i uzupełniane. Badania nad sygnałem Lif/STAT 1–3 mają dłuższą historię, ponieważ został on zidentyfikowany stosunkowo wcześniej jako niezbędny czynnik promujący proliferację i zapobiegający różnicowaniu się eKM u gryzoni. Dopiero najnowsze badania wykazały, że główną, częściowo komplementarną drogą działającą w ludzkich KM jest sygnał Wnt/ β -catenina [32, 36]. Co więcej, sygnał Wnt/ β -catenina podlega regulacji zarówno po-

przez naturalne i zsyntetyzowane ligandy [44] jak i pośrednio poprzez inhibicję regulującą negatywnie jego aktywność kinazy GSK3 β (inhibitory: BIO – *Tyrian purple indirubin*, Li+) oraz pośrednio przez aktywatory sygnału drogi PI3K/AKT. Szczególnie ciekawa jest tu rola fosfatazy PTEN, hamującej sygnał P-AKT, której rola w regulacji proliferacji i różnicowania komórek była znana od dawna, szczególnie w kontekście rozrostu nowotworowego [17].

W naszych badaniach na ludzkich neuralnych komórkach macierzystych (różnicujących się zarówno w neurony jak i komórki glejowe) pochodzących z krwi pępowinowej wykazaliśmy wzmocnioną ekspresję szeregu genów kodujących istotne białka obu dróg sygnałowych (Bużańska i wsp., dane nieopublikowane). Są to geny *lif*, *lifR*, *jak*, *stat*, *gp130* związane z sygnałem inicjowanym przez Lif oraz *wnt*, *frizzled*, *lrp*, β -*cateniny*, *cadheryna* i *tcf* charakterystyczne dla sygnału Wnt. Znajdujemy również ekspresję genów podstawowej drogi modulującej negatywnie sygnał Wnt: *GSK-3* i *PI3K/AKT*, wraz z całą gamą genów kodujących ich białka regulatorowe (np. *PTEN*) i współdziałających czynników wzrostowych oraz ich receptorów. Ciekawe, że część z nich ulega wzmocnieniu lub supresji w zależności od stanu proliferacji/zróżnicowania hodowli, co wskazuje na możliwość regulacji ich aktywności na poziomie transkrypcji. Również prowadzenie hodowli w obecności egzogennej Lif-u zwiększa wyraźnie pulę proliferujących komórek o fenotypie niezróżnicowanym, hamuje ich odpowiedź na czyn-



Ryc. 2. Zestawienie sygnałów wewnątrzkomórkowych istotnych dla utrzymywania macierzystego charakteru komórek progenitorowych (Wnt, Shh, Notch), oraz dla procesów ontogenezy. Wyłamanie się tych procesów z pod kontroli prowadzi do rozrostu nowotworowego komórek, (wg [33])

niki różnicujące (również po przeszczepie) i promuje tworzenie się w hodowli tzw. *neurosfer* – konglomeratów komórkowych typowych dla niezróżnicowanych, neuralnych KM otrzymywanych z innych źródeł.

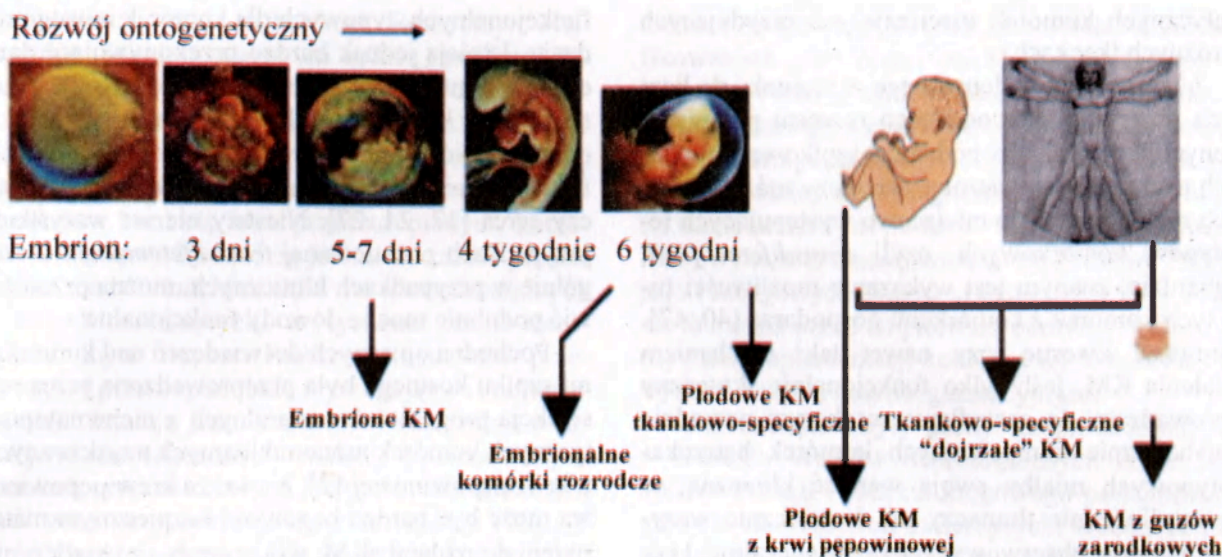
Ciekawa funkcjonalnie jest również zbieżność sygnału stymulującego proliferację KM z sygnałem antyapoptotycznym. Zwolnienie tego bloku w warunkach promujących różnicowanie może zwiększać podatnością komórek potomnych na selekcje w czasie organogenezy (tzw. apoptoza rozwojowa). Ta koincydencja również wydaje się odpowiadać za niebezpieczeństwo niekontrolowanej proliferacji KM prowadzącej do nowotworzenia jak również, w sensie pozytywnym, za skuteczność antyapoptotycznej modyfikacji KM przed przeszczepem. I tak np. nadekspresja AKT1 *ex vivo* w mezenchymalnych (mKM) komórkach macierzystych, zwiększała znacząco osiągany stopień repopulacji uszkodzonego mięśnia sercowego [22]. Tego rodzaju modyfikacja, poza postulowanym przez autorów działaniem cytoprotekcyjnym, pośrednio może wydłużać obecność niezróżnicowanych, proliferujących mKM w tkance po przeszczepie, przez co zwiększać ich ilość i migrację w uszkodzonym narządzie.

Odkryty ostatnio związek pomiędzy specyficznym dla ludzkich KM sygnałem Wnt/ β -catenina, a długotrwałym utrzymywaniem się samoodnowy tych komórek *in vitro*, może spowodować gwałtowny postęp w metodach hodowli linii KM. Miałoby to duże znaczenie w określeniu nowych standardów hodowli, niezależnych od bliżej niezdefiniowanych, a więc trudnych do kontroli czynników troficznych i wzrostowych obecnych w komórkach odżywczych (*feeder cells*) i surowicach zwierzęcych używanych obecnie. Należy podkreślić, że wprowadzanie odzwierzęcego materiału biologicznego do hodowli ludzkich linii komórkowych zawsze stanowi pewne niebezpieczeństwo, również epidemiologiczne, przy ich planowanym wykorzystaniu w klinice.

Dostępne źródła otrzymywania ludzkich KM

Komórki macierzyste można otrzymywać z tkanek znajdujących się na różnych szczeblach rozwoju osobniczego (Ryc. 3). Do celów terapeutycznych najbardziej pożądaną są zdefiniowane, stabilne linie ukierunkowanych tkankowo, samoodnowiających się KM. Chociaż w eksperymentach zwierzęcych opisywano dobre skutki transplantacji również nieukierunkowanych eKM w modelowych stanach patologicznych (np. w PD [1]), to jednak w znaczącej części przypadków ich różnicowanie wymykało się spod kontroli, a znaczący odsetek przeszczepów (ok. 20%) kończył się powstawaniem guzów nowotworowych. Hodowla dowolnej ilości zróżnicowa-

nych tkankowo, standardowych linii KM- czy to wyprowadzonych z pierwotnych linii eKM pochodzących z blastocysty czy też izolowanych z dostępnych nisz somatycznych komórek dojrzałych, również po ich ewentualnej *transdiferencjacji*, zapewniałaby łatwy dostęp lekarzy do materiału transplantacyjnego. Jednakże, ponieważ docelowo hodowle takie mają służyć regeneracji nieodwracalnie uszkodzonych narządów u chorych, problem ich biologicznego bezpieczeństwa jest szczególnie istotny. Konieczność wypracowania ogólnie obowiązujących, ściśle zdefiniowanych standardów hodowlanych została poruszona w rozdziale poprzednim. Niemniej istotne jest zagadnienie kontroli losu KM po przeszczepie. Liczne badania podstawowe podkreślają zbieżność cech KM i komórek nowotworowych takich jak niezróżnicowanie, klonogenność, odporność na apoptozę. Istnieje również uderzające podobieństwo szlaków sygnałowych promujących utrzymywanie proliferującej puli KM i onkogenezę (Ryc. 2). Poza wspomnianym już sygnałem Wnt/ β -catenina, którego rola w transformacji nowotworowej komórek różnych narządów była wielokrotnie wykazywana [33], również do takich „wspólnych” szlaków można zaliczyć dwa inne sygnały proliferacyjne: Notch i Shh (*Sonic hedgehog*) [39]. Niedojrzałe, pojawiające się przejściowo w rozwoju osobniczym, pluripotencjalne komórki macierzyste wężła zarodkowego blastocysty stanowiące jedyne źródło eKM, są w czasie hodowli poddane presji zupełnie nowego, sztucznego środowiska. Problem zmian kariotypu tych komórek w trakcie hodowli, możliwości rozrostu nowotworowego (*teratocarcinoma*) jak i nagromadzenie się okresowo „niemych”, niekontrolowanych zmian epigenetycznych, szczególnie ze strony genów imprintowanych [10] był od początku dokumentowany i dyskutowany przez różne grupy badawcze. Powrócił on spektakularnie w ostatnich miesiącach, gdy zespół Petera Andrews wykazał liczne zmiany chromosomalne występujące w standardowych, dostarczanych przez WiCell (linie wyprowadzone przez Thomson'a) i rekomendowanych przez NIH ludzkich liniach embrionalnych KM [5]. Zmiany akumulowały się na chromosomach 12 i szczególnie 17q, w których, jak wynika z innych badań, szczególnie często lokalizowane są geny typowe dla KM. Jak do tej pory nie wykazano podobnych zmian w długotrwanie hodowlanych, ale mniej licznych, liniach sKM, chociaż nie można ich również całkowicie wykluczyć. Jednak (na szczęście) długoletnie pozytywne doświadczenia kliniczne nad stosowaniem hematopoetycznych KM w przeszczepach szpiku spowodowały, że większość podejmowanych prób klinicznych terapii komórkowej była przeprowadzona z wykorzysta-



Ryc. 3. Źródła i charakter komórek macierzystych uzyskiwanych na różnych etapach rozwoju ontogenetycznego człowieka

niem właśnie tych sKM. W hodowanej przez nas unikalnej linii neuralnych KM wyselekcjonowanej z komórek występujących w krwi pępowinowej nie stwierdziliśmy do tej pory zmiany kariotypu (44 xy) w czasie długotrwałej jej ekspansji. Możliwe, że ontogenetycznie bardziej dojrzałe sKM są bardziej odporne na tego typu zmiany. Podstawowym zagadnieniem pozostaje jednak, na ile stwierdzona niestabilność genetyczna eKM jest stałym atrybutem tych komórek, a na ile ujawnia się ona jedynie w trakcie ich hodowli i selekcji *in vitro* lecz nie występuje w naturalnym środowisku *in vivo*. O ile pierwsza możliwość wykluczałaby właściwie możliwość stosowania eKM w klinice, to druga wymusiłaby jedynie zmiany metod hodowli (głównie skrócenie czasu), stosowania ścisłych, bezpiecznych standardów hodowlanych [34] i uważnej kontroli jakości przed przeszczepem.

Jeśli chodzi o dotychczasowe doświadczenia terapeutyczne oparte na sKM, to procedurą ogólnie zaakceptowaną klinicznie, powszechnie stosowaną i uznaną za stosunkowo bezpieczną są wspomniane już transplantacje szpiku kostnego. Jednak należy przypomnieć, że są to przeszczepy bezpośrednie i że ciągle nie udało się otrzymać krwiotwórczych KM w długotrwałej hodowli i ekspansji *in vitro*. W świetle ostatnich doniesień i wątpliwości co do stabilności genetycznej komórek hodowlanych, może to być korzystnym przypadkiem dla chorych, pomimo wszelkich trudności i ograniczeń związanych z wyszukiwaniem indywidualnego dawcy.

Bazując na doświadczeniach hematologów i fenomenologicznych obserwacjach losów przeszczepionych komórek szpikowych w materiale sekcyj-

nym byłych pacjentów, wskazuje się na szpik kostny jako potencjalne źródło również innych niż hematopoetyczne sKM. Zgodnie z tymi obserwacjami, KM szpiku kostnego mogą spontanicznie różnicować się do komórek mięśniowych, kardiomiocytów oraz komórek endotelialnych różnych narządów w tym, hepatocytów, komórek przewodów żółciowych i komórek wątroby, śródbłonka naczyń, nabłonkowych komórek nerek, neuronów i komórek glejowych [29]. Problem możliwości tzw. *transdiferencjacji* (zmiany naturalnego losu komórek progenitorowych określonej linii rozwojowej) lub też *pluripotencjalności* niektórych KM występujących w szpiku i innych niszach sKM, jest ciągle falsyfikowany doświadczalnie. Do najbardziej znaczących osiągnięć, przemawiających za istnieniem takich *pluripotencjalnych* progenitorów wśród sKM należy zaliczyć prace z grupy Catherine Verfaillie [13]. Wykazały one możliwość selekcji z komórek szpiku i dalszej nieograniczonej hodowli *in vitro* tzw. MAPC (ang. *multipotent adult progenitor cells*), różnicujących się do komórek linii należących do 3 różnych listków zarodkowych. Pomimo przedstawienia satysfakcjonujących dowodów doświadczalnych środowisko naukowe wykazuje duży opór przed zaakceptowaniem *transdiferencjacji* jako istotnego zjawiska biologicznego, występującego w pewnych warunkach środowiskowych. Pojawiły się koncepcje „spichrzania” przez szpik kostny małych ilości sKM obecnych w krwi obwodowej i prawdopodobnie wypłukiwanych ze swoich naturalnych nisz tkankowych [31]. Trzeba podkreślić, że ciągle nie ma jasności co do rodowodu ontogenetycznego so-

matycznych komórek macierzystych rezydujących w różnych tkankach.

Z krytycyzmu podnoszonego w stosunku do licznych obserwacji klonogenego rozrostu przeszczepionych komórek pochodzenia szpikowego w takich narządach jak wątroba, serce czy mózg *in vivo* i ich różnicowania do miejscowo występujących fenotypów komórkowych, czyli *transdiferencjacji*, najbardziej znanym jest wykazanie możliwości fuzji tych komórek z komórkami gospodarza [40, 47]. Pomijając kwestię, czy nawet taki mechanizm działania KM, jeśli tylko funkcjonalnie skuteczny i prowadzący do zasiedlenia w chorym narządzie metabolicznie kompetentnych komórek heterokariotypowych miałyby swoją wartość kliniczną, to niewątpliwie nie tłumaczy on dostatecznie wszystkich faktów obserwowanych doświadczalnie. I tak np. we wspomnianych już pracach z grupy Verfaillie obserwowana *in vitro* zmiana typowej ścieżki różnicowania mezenchymalnych progenitorów szpikowych, jak równie dobrze udokumentowana zmiana fenotypu multipotencjalnych komórek izolowanych ze skóry [42] zachodziły pod nieobecność komórek o fenotypie docelowym i nie wykazano w nich wstępowania jąder heterokariotypowych. Podobnie w naszych badaniach, zmiana fenotypu komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej zachodziła w warunkach jednorodnej hodowli *in vitro*, a więc bez możliwości wystąpienia fuzji z komórkami neuralnymi. Kariotyp tych komórek pozostawał niezmiennie diploidalny. Również *in vivo* niektóre zastosowane metody i wyszukane strategie eksperymentalne wydają się wykluczać możliwość fuzji jako podstawowego mechanizmu nabywania nowych cech przez komórki progenitorowe po ich przeszczepie i miejscowym rozroście klonalnym [16, 23, 26]. Również interesujące są obserwacje poczynione u matek posiadających męskie potomstwo. Wydaje się, że obserwowane klinicznie zaostrzenie się chorób autoimmunologicznych *post-partum*, może wynikać z przezłożyskowej penetracji allogenicznych komórek płodu. Po ich losowym wbudowaniu się w tkanki matki może to doprowadzać do nadreaktywności układu immunologicznego. Opisano przypadek poporodowego zapalenia tarczycy z licznymi „gorącymi” guzkami wykazującymi budowę chimeryczną i z obecnością w nich zróżnicowanych, pochodzących od płodu komórek gruczołowych o kariotypie XY lecz nigdy XXXY- co wykluczało możliwość ich powstania drogą fuzji [38].

Drugą często podnoszoną wątpliwością co do charakteru obserwowanej *transdiferencjacji* sKM zachodzącej zarówno *in vivo* jak i *in vitro* jest obawa, że komórki te przyjmują jedynie pewne cechy fenotypowe ale bez trwałego nabywania cech

funkcjonalnych, typowych dla komórek nowego rodzaju. Istnieją jednak bardzo przekonujące dane eksperymentalne uzyskane na gryzoniach, że przeszczepiane komórki szpikowe mogą w warunkach odpowiedniej presji środowiskowej generować funkcjonalnie sprawne komórki np. wątroby, mózgu czy serca [17, 24, 27]. Niestety nie we wszystkich przypadkach postulowanej *transdiferencjacji*, szczególnie w przypadkach klinicznych, można przedstawić podobnie mocne dowody funkcjonalne.

Pochodną opisanych doświadczeń nad komórkami szpiku kostnego była przeprowadzona przez nas selekcja progenitorów neuralnych z niehematopoeptycznych komórek mononuklearnych uzyskiwanych z krwi pępowinowej [2]. Na to, że krew pępowinowa może być bardzo bogatym i bezpiecznym materiałem do izolacji sKM, wskazywały doświadczenia hematologów nad stosowaniem jej w regeneracji krwiotwórczej funkcji szpiku kostnego. Również fakt, że krew pępowinową można zaliczyć do tkanek leżących na pograniczu rozwoju płodowego i dojrzałości (Ryc. 3) wydawał się nam obiecujący. Stosując selekcję *in vitro* subfrakcji komórek jednojądrzastych o fenotypie CD34(-) otrzymaliśmy populację zawierającą progenitory neuralne (nestin+), mogące w obecności neuromorfofenów różnicować się do komórek o fenotypie neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Co więcej, wykazaliśmy długotrwałą obecność klonogennych KM w niektórych przeprowadzonych izolatach takich progenitorów. Pozwoliło nam to na wyprowadzenie stałej linii nKM, wykazującej zaskakującą stabilność fenotypową i kariotypową (badania niepublikowane). Obecność progenitorów neuralnych w krwi pępowinowej została również wykazana przez badaczy amerykańskich [8, 35], a możliwość ich selekcji zgodnej z opisaną przez nas procedurą potwierdzona została aktualnie przez grupę niemiecką [7]. W obecnie prowadzonych badaniach otrzymana przez nas linia nKM pochodząca z krwi pępowinowej, po wykazaniu nabywania przez komórki licznych cech funkcjonalnych neuronów *in vitro*, jest testowana w kierunku użycia jej do przeszczepu terapeutycznego u zwierząt doświadczalnych. Ostatnio grupa amerykańska pracująca z nieselekcjonowanymi mononuklearnymi krwi pępowinowej, opublikowała zbiór prac doświadczalnych wskazujących na duży ich potencjał regeneracyjny po ich przeszczepie w doświadczalnych stacjach patologicznych OUN u zwierząt [6, 21, 48]. Jednak ciągle niewyjaśnionym problemem jest istota mechanizmu działania takich przeszczepów, potwierdzenie suplementacji chorej tkanki przez integrujące się KM oraz ustalenie jaki poziom neuralnego ukierunkowania i zróżnicowania *in vitro* przed

transplantacją jest najbardziej korzystny. Najprawdopodobniej poziom ten będzie zmienny i zależny od określonej jednostki patologicznej poddawanej terapii komórkowej. Również należy ustalić właściwy sposób przeszczepu komórek, rodzaj wskazanej cytoprotekcji oraz przeprowadzić długoterminową kontrolę losu przeszczepionych komórek. Dodatkową trudnością jest konieczność prowadzenia badań ludzkich KM na doświadczalnych modelach zwierzęcych, w systemie kseno-transplantacyjnym, wysoce niekorzystnym dla przeszczepu i prawdopodobnie wymagającym immunosupresji. Istnieją jednak dane doświadczalne o niskiej immunogenności słabo zróżnicowanych komórek progenitorowych, co pozwoliło niektórym badaczom na pominięcie immunosupresji [20]. W innych badaniach podkreśla się jednak konieczność głębokiej immunosupresji lub korzystania z kosztownych mutantów z niewydolnością układu immunologicznego.

Dotychczasowe doświadczenia w terapii komórkowej

Szybki w ostatnich latach postęp metod hodowli neuralnych KM *in vitro* [4] umożliwił przyspieszenie prac eksperymentalnych nad regeneracją uszkodzonej tkanki nerwowej. Od co najmniej 20 lat trwają próby kliniczne domózgowych przeszczepów tkanek zawierającej prekursor neuronów dopaminergicznych (rdzeń nadnerczy, określone okolice mózgu płodów, a nawet wyselekcjonowane neuralnie komórki guzów nowotworowych (hNT) w leczeniu choroby Parkinsona (PD). W ostatnich latach rozpoczęto intensywne badania nad przeszczepami KM [12]. W badaniach na gryzoniach przeprowadzono pomyślne próby suplementacji autologicznymi KM również i w innych chorobach neurodegeneracyjnych: w leukodystrofiach [28, 45], stwardnieniu zanikowym bocznym [6] czy też w zmianach niedokrwiennych i pourazowych CUN [3, 19, 21].

W klinice pierwsze próby leczenia lizosomalnych chorób spichrzeniowych przeszczepami allogenicznymi komórek szpikowych podjęto już przed 20 laty [9]. Przeprowadzono zabiegi na setkach pacjentów z zespołami Huntera, Maroteaux-Lamy, adrenoleukodystrofii, metachromatycznej leukodystrofii, fukozydozy, choroby Gauchera. Choroby te są nieuleczalne i w krótszym lub dłuższym czasie prowadzą do śmierci, zatem ocena działania tych zabiegów jest kontrowersyjna, aczkolwiek w kilku przypadkach potwierdzono częściową rekonstrukcję enzymatyczną i średnie przedłużenie czasu przeżycia u leczonych pacjentów. W każdym razie przeszczepy szpikowe nie zmieniały ostatecznie niepomyślnego rokowania u tych chorych [15]. W celu wyjaś-

nienia miejscowego mechanizmu działania zmodyfikowanych genetycznie mKM w modelu choroby Niemann-Picka przeprowadzono eksperymenty na myszach transgenicznym pozbawionych aktywności kwaśnej sfingomielinazy (ASM), której brak jest odpowiedzialny za wystąpienie tej choroby u ludzi. Po domózdkowym podaniu mKM z nadprodukcją ASM wykazano zmniejszoną utratę komórek Purkiniego i mózgowych złogów sfingomieliny [14]. Badania te można uznać za pierwszą pomyślną próbę rzeczywistej suplementacji komórkowej w spichrzeniowych chorobach neurodegeneracyjnych.

Najliczniejsze były próby terapii komórkowej w leczeniu skutków neurologicznych udaru oraz urazów mózgu i rdzenia kręgowego podejmowane głównie na modelach zwierzęcych. Obecność nieznacznych ilości ludzkich transplantowanych komórek wykrywano w uszkodzonej tkance mózgu i rdzenia do 35, a nawet 60 dni po przeszczepie. Natomiast w wielu badaniach podkreślano zaobserwowaną znaczną poprawę funkcjonalną u zwierząt leczonych w porównaniu z grupą kontrolną. Ze względu na znikomą ilość przeżywających i różnicujących się neuralnie KM wydaje się mało prawdopodobnym, aby obserwowana poprawa była związana z wbudowaniem się komórek dawcy w uszkodzoną sieć neuronalną. Wielu badaczy sugeruje, że są to wyłącznie skutki oddziaływania troficznego lub metabolicznego przeszczepianych komórek. W badaniach Chen'a i wsp. [3] wykazano, że w tkance ischemicznej mózgu po przeszczepie wykrywa się zwiększone ilości BDNF i NGF w porównaniu z grupą zwierząt nie poddanych transplantacji. Wykazano również dużą zdolność, szczególnie mKM do produkcji takich czynników *in vitro*. Czynniki troficzne i wzrostowe mogłyby oddziaływać stymulująco na rezerwy regeneracyjne uszkodzonego mózgu, włącznie z pobudzeniem endogennych KM znajdujących się w tkance gospodarza. W czasie badań nad wpływem transplantacji KM na przebieg regeneracji mózgu i rdzenia u gryzoni, zaobserwowano jeszcze jedno bardzo interesujące zjawisko. Wydaje się mianowicie, że KM pochodzące z komórek mezenchymalnych szpiku kostnego i podane do krwioobiegu migrują selektywnie do miejsca uszkodzenia różnych narządów, w tym również do mózgu, przechodząc nawet przez nieuszkodzoną barierę krew/mózg. Podjęto więc próby zidentyfikowania chemokin czynnych w tym procesie [43]. Podobne „zadamawianie” się transplantowanych KM pochodzenia szpikowego obserwowano również w przypadku regeneracji serca i innych narządów [30]. Trwają intensywne badania nad poznaniem molekularnego podłoża tego terapeutycznie bardzo istotnego zjawiska.

Osobnym zagadnieniem są próby terapii komórkowej w przypadku stwardnienia rozsianego. Ze względu na jego systemowe, autoimmunologiczne podłoże, strategia bezpośredniej suplementacji ognisk demielinizacyjnych progenitorami oligodendrocytów nie wydaje się być wystarczająca. Natomiast patologiczna nadreaktywność limfocytów T może zostać sfumiona poprzez allogeniczne przeszczepy hematopoetycznych KM szpiku, które wywołując długotrwały efekt immunosupresyjny w organizmie biorcy, mogą wspomagać przeżycie w mózgu równolegle przeszczepionych oligodendrocytów [25].

Intensywne prace eksperymentalne prowadzone są również w celu uzyskania KM do terapii innych narządów m.in. produkujących insulinę komórek β wysepek trzustki, progenitorów komórek mięśni (tzw. komórek satelitarnych), do zainicjowania regeneracji genetycznie uwarunkowanych zaników mięśni szkieletowych, jak również, po podaniu do sercowym, do zróżnicowanych kardiomiocytów. Wszystkie te badania znajdują się we wczesnej fazie eksperymentalnej i mają stosunkowo krótką historię, a interpretacja uzyskanych wyników jest pełna niejasności i wymaga bardzo krytycznego podejścia. Dlatego też ich skrótowe omówienie nie jest tutaj możliwe, a zainteresowanych należy odesłać do literatury źródłowej.

Piśmiennictwo

1. Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I.Y., McNaught K.S., Brownell A.L. et al.: Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 2344–2349.
2. Burzańska L., Machaj E.K., 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. 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.
4. Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M., Comi G.P.: Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. *Curr. Gene Ther.*, 2003, 3, 247–272.
5. Draper J.S., Smith K., Gokhale P., Moore H.D., Maltby E., Johnson J., Meisner L. et al.: Recurrent gain of chromosome 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 53–54.
6. Garbuzova-Davis S., Willing A.E., Zigova T., Saporta S., Justen E.B., Lane J.C., Hudson J.E. et al.: 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.
7. Greschat S., Rosenbaum C., Moers J., Koegler G., Wernet P., Miller H.: Characterisation of human umbilical cord blood stem cells *in vitro* and implantation into rat brain. Abstract on ISN Meeting 2003.
8. Ha Y., Choi J.U., Yoon D.H., Yeon D.S., Lee J.J., Kim H.O., Cho Y.E.: Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *Neuroreport*, 2001, 12, 3523–3527.
9. Hobbs J.R., Hugh-Jones K., Barrett A.J., Byrom N., Chambers D., Henry K., James D.C. et al.: Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*, 1981, 2, 709–712.
10. Humpherys D., Eggan K., Akutsu H., Hochedlinger K., Rideout W.M. 3rd, Binischewicz D., Yanagimachi R., Jaenisch R.: Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293, 95–97.
11. Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H., Park E.S., Lee E.G., Koo J.M., Jeon H.Y. et al.: Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 2004, 303, 1669–1674.
12. Janowski M., Domańska-Janik K.: Perspektywy terapii komórkowej w chorobie Parkinsona, W: Monitorowane klinimetrycznie rozpoznawanie i leczenie choroby Parkinsona. Medical Communications, Warszawa 2004 (w druku).
13. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M. et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418, 41–49.
14. Jin H.K., Carter J.E., Huntley G.W., Schuchman E.H.: Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J. Clin. Invest.*, 2002, 109, 1183–1191.
15. Kaufman C.L., Ildstad S.T.: Leukodystrophy and bone marrow transplantation: role of mixed hematopoietic chimerism. *Neurochem. Res.*, 1999, 24, 537–549.
16. Korbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z.: Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *New Engl. J. Med.*, 2002, 346, 738–746.
17. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X. et al.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 2000, 6, 1229–1234.
18. Li L., Liu F., Ross A.H.: PTEN regulation of neural development and CNS stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 2003, 88, 24–28.
19. Li Y., Chen J. i wsp.: Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*, 2002, 59, 514–523.
20. Liker M.A., Petzinger G.M., Nixon K., McNeill T., Jakowec M.W.: Human neural stem cell transplantation in the MPTP-lesioned mouse. *Brain Res.* 2003, 971, 168–177.
21. Lu D., Sanberg P.R., 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.

22. Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., He H., Rezvani M., Ingwall J.S., Dzau V.J.: Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 2003, 1195–1201.
23. Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B.: Transplanted bone marrow generates new neurons in human brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 1364–1369.
24. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R.: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science*, 2000, 290, 1779–1782.
25. Muraro P.A., Cassiani Ingoni R., Martin R.: Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: current status and future challenges. *Curr Opin. Neurol.* 2003, 299–305.
26. Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., Kanai T., Mukai M., Okamoto S., Ikeda Y. et al.: Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.*, 2002, 8, 1011–1017.
27. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J. et al.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410, 701–705.
28. Pluchino S., Quattrini A., Brambilla E., Critti A., Salani G., Dina G., Galli R. et al.: Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*, 2003, 422, 688–694.
29. Poulson R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002, 297, 441–456.
30. Rafii S., Lyden D.: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.*, 2003, 9, 702–712.
31. Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R., Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J.: Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells „hide out” in the bone marrow. *Leukemia*, 2004, 29–40.
32. Reya T., Duncan A.W., Ailles L., Domen J., Scherer D.C., Willert K., Hintz L. et al.: A role for Wnt signaling in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, 423, 409–414.
33. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.: Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414, 105–111.
34. Rosenberg R.F.: The choice of cell lineages during the *in vitro* differentiation of mammalian embryonic stem cells. *J. Theor. Biol.*, 2003, 223, 387–389.
35. Sanchez-Ramos J., Song S., Kamath S.G. et al.: Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp. Neurol.*, 2001, 171, 109–115.
36. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A.H.: Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signalling by a pharmacological GSK-3 specific inhibitor. *Nat. Med.*, 2004, 10, 55–63.
37. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D.: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988, 336, 688–690.
38. Srivatsa B., Srivatsa S., Johnson K.L., Samura O., Lee S.L., Bianchi D.W.: Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet*, 2001, 358, 2034–2038.
39. Taipale J., Beachy P.A.: (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 2001, 411, 349–354.
40. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M. et al.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002, 416, 542–545.
41. Thomson J.A., Itskovitz E., Shapiro S.S.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282, 1145–1147.
42. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnabe-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D.: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biol.*, 2001, 3, 778–784.
43. Wang L., Li Y., Chen X., Chen J., Gautam S.C., Xu Y., Chopp M.: MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology*, 2002, 7, 113–117.
44. Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T., Yates J.R. 3rd, Nussle R.: Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003, 423, 448–452.
45. Windrem M.S., Nunes M.C., Rashbaum W.K., Schwartz T.H., Goodman R.A., McKhann G. 2nd, Roy N.S., Goldman S.A.: Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat. Med.* 2004, 10, 93–97.
46. Wright L.S., Li J., Caldwell M.A., Wallace K., Johnson J.A., Svendsen C.N.: Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J. Neurochem.*, 2003, 86, 179–195.
47. Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G.: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, 416, 545–548.
48. Zigova T., Song S., Willing A.E., Hudson J.E., Newman M.B., Saporta S., Sanchez-Ramos J. et al.: Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant.*, 2002, 11, 265–274.