

# Konsekwencje fizjologiczne i patologiczne występowania komórek linii zarodkowych w dorosłych tkankach

Physiological and pathological consequences of a presence of germ line stem cells in adult tissues

Ratajczak Mariusz Z.<sup>1,2</sup>, Machaliński Bogusław<sup>3</sup>, Czajka Ryszard<sup>4</sup>, Zuba-Surma Ewa<sup>2</sup>, Poziomkowska-Gęsicka Iwona<sup>1</sup>, Słowik-Żyłka Dorota<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Fizjologii Katedry Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

<sup>2</sup> Instytut Komórki Macierzystej, Centrum Rakowe im. Jamesa Grahama Browna, Uniwersytet Louisville, USA

<sup>3</sup> Zakład Patologii Ogólnej Katedry Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

<sup>4</sup> Klinika Potóżnictwa i Ginekologii Katedry Potóżnictwa, Ginekologii i Neonatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

## Streszczenie

*Strategie lecznicze oparte o wykorzystanie terapeutyczne komórek macierzystych stwarzają nadzieję na opracowanie efektywnych metod leczniczych dla szeregu schorzeń do tej pory nieuleczalnych innymi metodami.*

*Noworozwijająca się dziedzina nauk medycznych jaką jest medycyna regeneracyjna wiąże duże nadzieje z postępowaniem w wykorzystaniu komórek macierzystych w leczeniu np. zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu, uszkodzeń rdzenia kręgowego, cukrzycy czy też choroby Parkinsona. Wykorzystanie embrionalnych komórek macierzystych izolowanych z zarodków budzi w licznych kręgach społecznych wiele emocji natury etyczno-religijnej. Dlatego też duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem komórek izolowanych z tkanek dorosłych osobników.*

*Zespół nasz ostatnio wyizolował z tkanek dorosłych osobników wczesną populację komórek macierzystych (VSELs), które posiadają wiele cech wczesnych komórek embrionalnych.*

*Uważamy, że komórki te mogą stać się w medycynie regeneracyjnej alternatywnym źródłem najwcześniejszych rozwojowo komórek pozyskiwanych do tej pory z zarodków.*

Słowa kluczowe: **VSELs / Oct-4 / komórki pluripotencjalne / regeneracja / „plastyczność”**

## Adres do korespondencji:

Mariusz Z. Ratajczak  
Zakład Fizjologii katedry Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej,  
70-111 Szczecin, Al. Powst. Wlkp. 72  
tel. 091 4661611  
e-mail: mzrata01@louisville.edu

Otrzymano: 10.08.2009  
Zaakceptowano do druku: 15.11.2009

## Abstract

*Various therapeutic strategies employing stem cells have been proposed as the alternative, effective methods for therapy of multitude diseases, difficult to treat using standard, well-established methods.*

*Advancing regenerative medicine, which is becoming a novel branch of clinical medicine, has high hopes of stem cells which could be used in treatment of injured organs such as myocardium after heart infarction, brain after stroke, spinal cord after mechanical injury as well as in treatment of diabetes and Parkinson disease. Application of embryonic stem cells, harvested from developing embryos, is highly controversial. Hence, the stem/primitive cells isolated from adult tissues are considered to be an optimal source of cells for therapy.*

*Recently, our reaserch team has isolated a population of very primitive stem cells from adult tissues (very small embryonic-like stem cells – VSELs) that show several embryonic-like features.*

*These cells can become an alternative and more ethical source of the stem cells for therapy when compared to those isolated from the developing embryos.*

Key words: **VSELs / Oct-4 / pluripotent stem cells / regeneration / “plasticity” /**

## Wstęp

Mianem komórki macierzystej określa się komórkę posiadającą zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się w komórki potomne. Definicja ta jest jednak zbyt uproszczona. Wyróżniamy, bowiem wiele rodzajów komórek macierzystych, różniących się pomiędzy sobą potencjałem proliferacyjnym oraz zdolnością do różnicowania. W rzeczywistości komórki macierzyste są bardzo różnorodne i trudno je jednoznacznie opisać jedną wspólną definicją. Pula komórek macierzystych utrzymuje w równowadze liczbę komórek somatycznych w organizmie, jest odpowiedzialna za odnawianie zużywających się z czasem komórek somatycznych, a tym samym za regenerację narządów i tkanek. Z tego powodu komórkom macierzystym poświęca się coraz więcej uwagi i uważa, że technologie prowadzące do optymalizacji ich klinicznego wykorzystania staną się kluczem do długowieczności w rozwijającej się jako nowa dyscyplina kliniczna medycynie regeneracyjnej.

Założeniem medycyny regeneracyjnej jest wykorzystanie komórek macierzystych w terapii uszkodzonych narządów i tkanek. Uważa się, że przeszczepianie całych narządów będzie w przyszłości coraz częściej zastępowane przeszczepami zawiesiny komórek macierzystych, swoistych dla danego narządu, które będą miały za zadanie regenerację/odbudowę uszkodzonych tkanek. Szczególne nadzieje na wykorzystanie terapeutyczne komórek macierzystych wiąże się z takimi schorzeniami, jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, parkinsonizm, cukrzyca, dystrofia mięśniowa, toksyczne uszkodzenia wątroby i nerek. Wydaje się, że człowiek zaczyna sięgać po upragniony klucz do długowieczności.

## Potencjalne źródła komórek macierzystych do regeneracji tkankowo/narządowej

Już od około 40 lat wykorzystuje się krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) w leczeniu szeregu chorób układu krwiotwórczego. Coraz częściej stosuje się również komórki macierzyste naskórka w leczeniu oparzeń skóry, lub dla usprawnienia procesu gojenia się owrzodzeń troficznym kończyn. Zaawansowana jest również technologia pozyskiwania fibroblastów szpiku kostnego (tzw. macierzystych komórek mezenchymalnych) dla leczenia ubytków kostnych. Wspólną cechą komórek macierzystych krwiotwórczych, naskórka, czy mezenchymalnych jest stosunkowo duża łatwość ich pozyskania. W przeciwieństwie do powyższych komórek macierzystych, ze zrozumiałych względów

etycznych i technicznych, znacznie trudniej jest uzyskać od zdrowych dawców komórki macierzyste innych tkanek i narządów, jak np. mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby, wysepek trzustki lub ośrodkowego układu nerwowego, w ilościach pozwalających na ich potencjalne wykorzystanie terapeutyczne.

W związku z powyższym, w ostatnich latach duże nadzieje wzbudziła teoria tzw. „plastyczności KKM” lub ich zdolności do „transróżnicowania”. Zgodnie z tą teorią KKM pozyskane np. ze szpiku kostnego, skąd stosunkowo łatwo je wyizolować, byłyby zdolne do odróżnicowania się w komórki macierzyste swoiste dla innych narządów np. mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego lub wątroby. W chwili obecnej uważa się jednak, że wykazywana przez niektórych badaczy plastyczność KKM w rzeczywistości była prawdopodobnie wynikiem artefaktów doświadczalnych.

## Komórki niehematopoetyczne szpiku kostnego – lekcja wyływająca z tzw. „zjawiska plastyczności” krwiotwórczych komórek hematopoetycznych (KKM)

Ogromne nadzieje pokłada się w potencjonym zastosowaniu KKM izolowanych ze szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, w terapiach regeneracyjnych uszkodzonych narządów i tkanek [1,2,3]. Oczekiwania te budowano na postulowanym przez niektórych badaczy zjawisku plastyczności przypisywanym tym komórkom i wynikającej z tego jak sugerowano zdolności do transróżnicowania w komórki różnych linii niehematopoetycznych. Szereg artykułów naukowych poparło teorię plastyczności KKM demonstrując pozytywne wyniki wykorzystania tych komórek w zwierzęcych modelach regeneracyjnych w zawale serca, udarze mózgu, mechanicznym uszkodzeniu rdzenia kręgowego oraz toksycznym uszkodzeniu wątroby [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].

Pomimo przytoczonych powyżej obiecujących wyników rola szpiku kostnego oraz zawartych w nim komórek, w regeneracji uszkodzonych narządów, pozostaje jednak wciąż kontrowersyjna [9,10]. Seria badań z zastosowaniem fenotypowo zdefiniowanych i oczyszczonych subpopulacji macierzystych komórek hematopoetycznych, przyniosła bowiem rozczarowanie ukazując negatywne wyniki w modelach regeneracji mięśnia sercowego oraz mózgu [11, 12, 13]. Te nieoczekiwane obserwacje podważyły koncepcje plastyczności komórek macierzystych układu krwiotwórczego [9, 14].

Wspomniane niezgodności w wynikach opublikowanych w literaturze światowej, mogą być tłumaczone różnicami wynikającymi z zastosowania różnych modeli uszkodzenia tkanek przez różne laboratoria, jak również problemami w detekcji chimeryzmu komórkowego. W tabeli I przedstawiono alternatywne wyjaśnienia tzw. zjawiska plastyczności KKM.

Po pierwsze, uwidocznienie zjawiska plastyczności może zależeć od zastosowania odpowiednich modeli uszkodzenia tkanek oraz związanych z nimi indukcji czynników sprzyjających „plastyczności” KKM. Hipotetycznie, tego typu „sprzyjające” warunki mogłyby dotyczyć zmian epigenetycznych w macierzystych komórkach krwiotwórczych, stymulując je do różnicowania się w kierunku komórek innych linii niż linia hematopoetyczna [15, 16]. Po drugie, na podstawie opublikowanych doniesień, plastyczność KKM może być wyjaśniona poprzez fenomen fuzji komórkowej [17-21]. Według tej teorii, przeszczepiane KKM, mogłyby ulegać fuzji (stopieniu) z komórkami uszkodzonych narządów. Tak więc komórki w uszkodzonych narządach, leczonych przeszczepionymi KKM, są wtedy heterokarionami powstałymi na skutek fuzji przeszczepionych KKM oraz komórek należących do uszkodzonego narządu. Warto nadmienić jednak, że zarówno fuzja komórkowa, jak i zmiany epigenetyczne zachodzą w komórkach po przeszczepie, należą do bardzo rzadkich, przypadkowych zjawisk i nie mogą w pełni tłumaczyć opublikowanych, pozytywnych wyników badań wskazujących na transróżnicowanie KKM. Co więcej, niektóre opublikowane ostatnio wyniki badań, wydają się wykluczać zjawisko fuzji, jako główny proces prowadzący do chimeryzmu komórkowego obserwowanego po przeszczepie [22-24].

Kolejnym możliwym wytłumaczeniem pozytywnych efektów terapeutycznych w próbach regeneracji tkanek i narządów z zastosowaniem komórek szpiku kostnego, może być efekt parakryny przeszczepionych komórek szpiku na komórki

uszkodzonego organu. Macierzyste komórki hematopoetyczne są bowiem znane jako źródło wielu czynników wzrostowych oraz cytokin mogących potencjalnie promować procesy regeneracyjne oraz waskularyzację, jeśli czynniki te zostaną wydzielone przez przeszczepione komórki szpiku w miejscu uszkodzenia [25].

Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość modyfikacji fenotypu komórek znajdujących się w tkankach poprzez przeniesienie receptorów komórkowych, białek cytoplazmatycznych oraz mRNA z sąsiednich komórek, za pomocą wymiany mikrofragmentów komórkowych (*microvesicles*). Mikrofragmenty komórkowe są kulistymi strukturami, w których fragment cytoplazmy komórkowej jest otoczony błoną komórkową [26-29]. Złuszczenie mikrofragmentów z powierzchni błony komórkowej opisane zostało jako zjawisko fizjologiczne towarzyszące wzrostowi komórek oraz ich aktywacji w procesach, takich jak np.: niedotlenienie tkanek, czy ich uszkodzenie [30-32].

W związku z tym, wspomniane przeniesienie receptorów powierzchniowych, białek oraz informacji genetycznej, jaką jest mRNA, pomiędzy wszczepionymi KKM szpiku kostnego, a komórkami gospodarza za pomocą mikrofragmentów błonowych, mogłoby przejściowo prowadzić do zmiany fenotypu komórek uszkodzonego organu. Wciąż pozostaje otwartym pytanie, czy mikrofragmenty komórkowe mogą także przenosić niektóre markery reporterowe, stosowane do wykrywania chimeryzmu, takie jak np. białko posiadające zieloną fluorescencję (*green fluorescence protein* – GFP), czy  $\beta$ -galaktozydazę.

Co wydaje się jednak najważniejsze, w trakcie badań mających na celu wyjaśnienie plastyczności komórek macierzystych oraz wkładu prymitywnych komórek szpikowych w regenerację uszkodzonych narządów, nie wzięto pod uwagę możliwości, że szpik kostny zawiera heterogenną populację komórek macierzystych [33, 34]. (Tabela I).

Tabela I. Alternatywne wyjaśnienia zjawiska transróżnicowania lub plastyczności krwiotwórczych komórek macierzystych (*hematopoietic stem cells* - KKM).

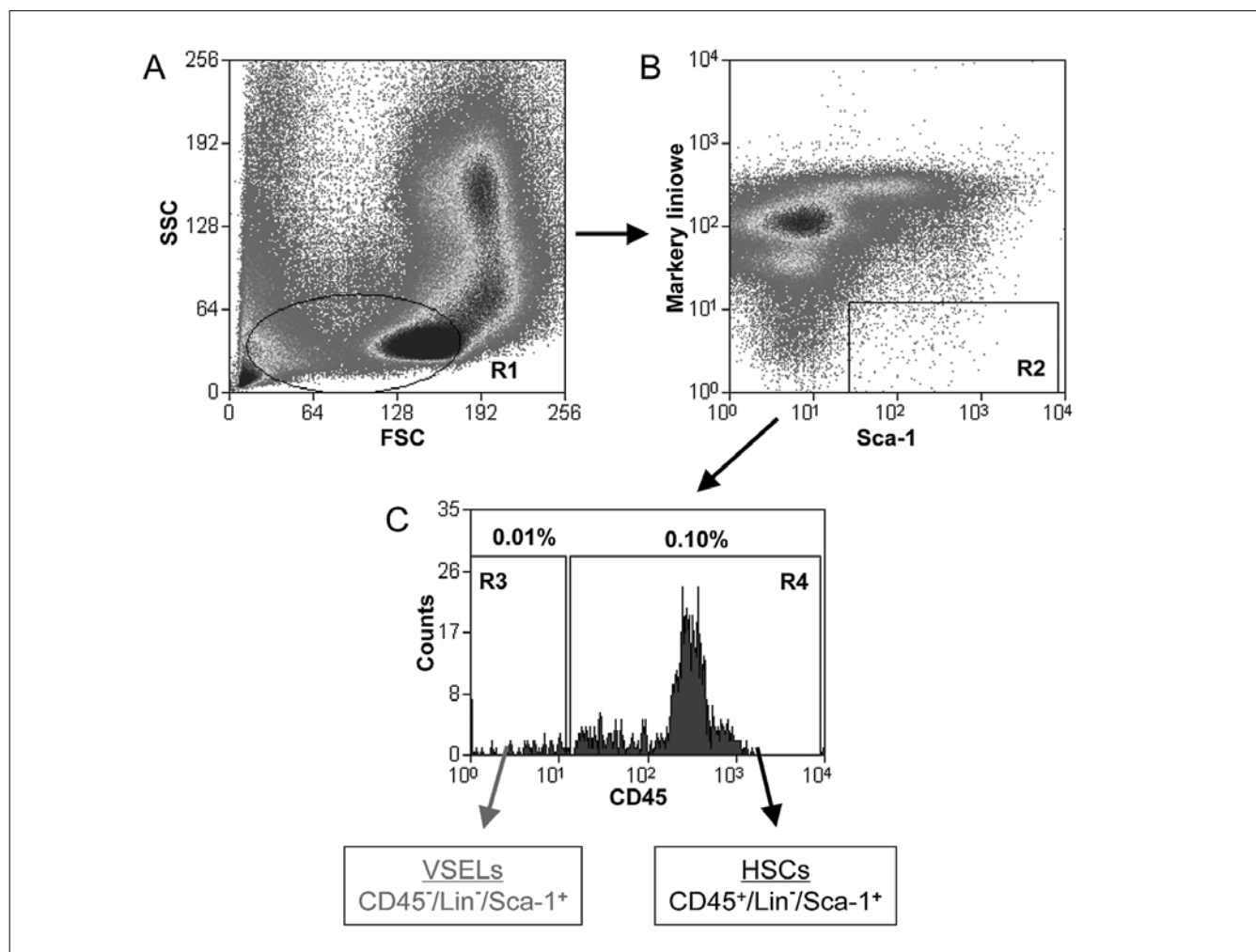
<b>Zmiany epigenetyczne</b>	Czynniki środowiskowe uszkadzające tkanki/organy mogą indukować zmiany epigenetyczne w genach regulujących pluripotencję KKM (powodując zmiany w metylacji DNA, acetylację histonów). Więcej dowodów jest wymaganych, aby potwierdzić powszechność tego zjawiska.
<b>Fuzja komórkowa</b>	Bardzo rzadkie zjawisko, w którym przeszczepione KKM zlewają się (ulegają fuzji) z komórkami uszkodzonej tkanki, tworząc heterokariony. Powstałe heterokariony wykazują ekspresję markerów komórek KKM przeszczepu i uszkodzonych komórek tkanek gospodarza (pseudochimeryzm).
<b>Stymulacja parakryna</b>	KKM stanowią źródło różnych czynników wzrostowych i angiopoetycznych, mogących promować regenerację tkanek/organów.
<b>Transfer molekuł poprzez mikrofragmenty błonowe</b>	Niektóre doniesienia o plastyczności komórek macierzystych mogą być wyjaśnione za pomocą zjawiska czasowej zmiany fenotypu komórkowego, będącego wynikiem przeniesienia receptorów, białek cytoplazmatycznych oraz mRNA pomiędzy KKM, a uszkodzoną komórką, za pomocą mikrofragmentów błonowych.
<b>Obecność heterogennej populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym</b>	Oprócz komórek KKM, szpik kostny zawiera także inne populacje komórek macierzystych. Regeneracja uszkodzonych tkanek może zostać wyjaśniona obecnością komórek progenitorowych dla śródbłonna naczyń, które stymulują neowaskularyzację, jak również obecnością innych komórek macierzystych, w tym komórek pluripotencjalnych (np. VSELs). Fakt ten może wyjaśniać brak efektów plastyczności z użyciem wysoko oczyszczonej populacji KKM.

Uważamy, że nieuwzględnienie takiej możliwości oraz brak odpowiednich kontroli w prowadzonych badaniach nad regeneracją tkanek niehematopoetycznych z udziałem przeszczepionych komórek szpiku kostnego oraz krwi pępowinowej, doprowadziło do wielu nieścisłości i niewłaściwych interpretacji omawianych zjawisk plastyczności. Zgodnie z powyższym uważamy, że najlepszym wyjaśnieniem zjawiska plastyczności KKM wydaje się fakt obecności heterogenicznej populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym, w mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, których to udział w regeneracji uszkodzonych tkanek może tłumaczyć opisywane zjawiska „plastyczności i transróżnicowania” KKM [33,34].

Fakt występowania niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym może wyjaśnić bardziej wiarygodnie niż transróżnicowanie KKM pozytywne wyniki „plastyczności” uzyskane przez wielu badaczy, którzy stosowali komórki szpikowe w regeneracji uszkodzonych narządów [2-5].

Co więcej, w przypadkach kiedy stosowano wyselekcjonowane, oczyszczone KKM, komórki macierzyste niehematopoetyczne prawdopodobnie były usuwane na etapie izolacji komórek do przeszczepu powodując, że przeszczepiane komórki nie różnicowały się w inne tkanki i nie obserwowano tym samym zjawiska plastyczności.

Podsumowując, na obecnym etapie badań, zjawiska transróżnicowania KKM w komórki linii niehematopoetycznych oraz ich wkład w regenerację uszkodzonych tkanek nadal pozostają wątpliwe i bardzo słabo udokumentowane. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem pozytywnych wyników „plastyczności” jest fakt występowania w szpiku kostnym populacji pluripotencjalnych komórek macierzystych.



**Rycina 1. Izolacja VSELS ze szpiku kostnego dorosłych myszy za pomocą FACS.**

Rycina przedstawia strategię izolacji VSELS za pomocą sortowania FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Komórki szpiku kostnego izolowano z kości udowych i piszczelowych kończyn dolnych, 4-8 tygodniowych myszy szczepu C57BL/6. Erytrocyty usuwano za pomocą lizy, a pełną populację szpiku kostnego barwiono stosując przeciwciała monoklonalne przeciwko mysim antygenom CD45 i Sca-1 oraz markerom specyficznym dla linii hematopoetycznych. Stosowano przeciwciała bezpośrednio skoniugowane z fluorochromami (BD Pharmingen, USA).

**Panel A** przedstawia rozmieszczenie komórek w zależności od parametrów FSC (*Forward Scatter*) i SSC (*Side Scatter*) komórek, zależnych odpowiednio od wielkości oraz ziarnistości tych komórek. Region R1 zawiera komórki małe (2-8µm) o morfologii limfocytarnej. Komórki z tego regionu przedstawiono na **Panelu B** w zależności od ekspresji markerów liniowych oraz Sca-1. Komórki o fenotypie Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> analizowano dalej pod względem ekspresji antygenu CD45 (**Panel C**).

VSELS sortowano jako komórki o fenotypie CD45<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> (region R3), natomiast KKM, jako CD45<sup>high</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> (region R4). Procent przedstawia średnią zawartość każdej z populacji wśród wszystkich komórek jednojądrowych szpiku kostnego myszy.

## Szpiczek kostny jako źródło pluripotencjalnych komórek macierzystych

Kilka lat temu nasz zespół, zaproponował alternatywne wyjaśnienie omawianego zjawiska plastyczności KKM. Założyliśmy, że szpiczek kostny jest źródłem heterogennej populacji komórek macierzystych i zawiera obok KKM, komórki pluripotencjalne, które to mogą różnicować się w inne tkanki, dając tym samym złudzenie, że KKM są plastyczne [35, 36].

Komórki takie udało się nam ostatnio wyizolować ze szpiku kostnego [37, 38]. Badania tych komórek na poziomie mRNA, wykazały wysoką ekspresję wczesnych, tkankowo specyficznych genów regulujących procesy różnicowania komórkowego w kierunku linii niehematopoetycznych, przy jednoczesnej ekspresji szeregu embrionalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak Oct-4, Nanog i Rex-1 [39].

W oparciu o powyższe obserwacje, postanowiliśmy takie komórki wyizolować ze szpiku kostnego. Na podstawie wstępnych badań przyjęliśmy, że komórki te:

- będą wykazywały ekspresję receptora CXCR4 (komórki mysie i ludzkie) oraz antygenów CD133 (komórki mysie i ludzkie) i Sca-1 (komórki mysie);
- będą niehematopoetyczne, a więc CD45<sup>-</sup>;
- oraz będą bardzo małe (2-4 μm średnicy).

Strategię izolacji wspomnianej populacji, bardzo małych (2-4 μm), Sca-1<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> komórek z mysiego szpiku kostnego z użyciem FACS przedstawia rycina 1. Komórki te posiadają ekspresję szeregu markerów komórek pluripotencjalnych, takich jak SSEA-4, Oct-4, Rex-1 i Rif-1, zarówno na poziomie RNA, jak i białka. Jednocześnie są one negatywne pod względem obecności antygenów zgodności tkankowej MHC-I i MHC-II (HLA-DR) oraz molekuł specyficznych dla linii mezenchymalnej, takich jak CD90, CD105 i CD29 [40].

Co ważniejsze, bezpośrednie badania tych komórek, izolowanych z mysiego szpiku kostnego, przy użyciu elektronowego mikroskopu transmisyjnego, wykazały obecność cech charakterystycznych dla komórek embrionalnych, takich jak:

- obecność dużego jądra komórkowego otoczonego wąskim rąbkiem cytoplazmy oraz
- występowanie luźnej chromatyny (euchromatyny) w jądrze komórkowym.

Co najważniejsze, pomimo bardzo małego rozmiaru, komórki te jak wykazaliśmy zawierają prawidłową, diploidalną liczbę chromosomów, a także liczne mitochondria. Odnaczają się one również wysoką aktywnością telomerazy jądrowej. W oparciu o powyższe kryteria, określiliśmy opisane przez nas komórki mysiego szpiku kostnego mianem „bardzo małych komórek macierzystych, podobnych do komórek embrionalnych” (*very small embryonic-like stem cells* - VSELs) [37]. Strategię izolacji VSELs z mysiego szpiku kostnego przedstawiono na rycinie 1.

Stosując cytometrię przepływową udało się nam również zidentyfikować podobne Sca-1<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> komórki w tkankach większości mysich organów, m.in. w nerkach, płucach, sercu oraz jądrach. Zaobserwowaliśmy, że w zależności od niszy tkankowej, wielkość VSEL-SC może być różna. Komórki odpowiadające mysim VSELs wykryliśmy ostatnio również w ludzkiej krwi pępowinowej co wskazuje, że występują one również w tkankach człowieka [41].

Dotychczasowe wyniki otrzymane w naszym laboratorium wskazują na obecność w większości dorosłych tkanek, prymitywnej populacji pluripotencjalnych komórek macierzystych, wywodzących się z epiblastu. Komórki te jak uważamy mogą zostać zdeponowane w rozwijających się organach w czasie gastrulacji, we wczesnych etapach embriogenezy, gdzie przeżywają następnie do czasu kiedy organizm osiąga dojrzałość [42]. Cechą charakterystyczną tych komórek jest ekspresja genów typowych dla pluripotencjalnych komórek epiblastu, takich jak SSEA-4, Oct-4 i Nanog. Hipotezę tą potwierdzają ostatnie dane literaturowe wykazujące obecność komórek macierzystych posiadających markery komórek epiblastu (np. Oct-4, SSEA) nie tylko w szpiku kostnym, ale również w tkankach wielu organów niehematopoetycznych, jak naskórek, nabłonek oskrzeli, mięsień sercowy, trzustka, jądra, miazga zębowa, siatkówka [54, 55] oraz w płynie owodniowym [37, 43-56]. Morfologia tych komórek oraz ich wielkość może się nieznacznie różnić w zależności od typu tkanki/ narządu, w którym się znajdują oraz miejsca lokalizacji w poszczególnych narządach. Ekspresja markerów epiblastu przez te komórki, potwierdza naszą koncepcję o zdeponowaniu we wczesnych etapach embriogenezy w rozwijających się organach Oct-4<sup>+</sup> komórek macierzystych pochodzących z epiblastu [42, 57]. Opisane komórki macierzyste dojrzałego organizmu tworzą własne identyczne kopie, dając początek dojrzałym linom komórek somatycznych, różnicując się w zależności od środowiska w jakim się znajdują [55].

## Różnicowanie mysich VSELs *in vitro*

Opisane przez naszą grupę VSELs stanowią bardzo rzadką populację komórek znajdujących się w dorosłym szpiku kostnym (ok. 1 komórka VSEL na 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> komórek jednojądrowych mysiego szpiku) [37]. Z obserwacji naszych wynika także, że szpiczek kostny młodych myszy zawiera więcej komórek o fenotypie VSELs i liczba tych komórek maleje z wiekiem osobnika [37].

Myśląc o wykorzystaniu tych komórek do potencjalnych celów terapeutycznych, niezbędnym staje się szybkie opracowanie skutecznej metody ekspansji tych komórek *ex vivo*.

Prowadzimy więc intensywne prace nad opracowaniem składu „skutecznego koktailu czynników wzrostowych”, stymulujących proliferację VSELs. W oparciu o nasze dotychczasowe obserwacje, VSELs wymagają jednak do proliferacji nie tylko medium hodowlanego o odpowiednim składzie, ale również sygnałów kostymulujących w hodowlach z innymi komórkami (np. mysimi fibroblastami podścieliska szpiku kostnego). W takich warunkach hodowlanych, VSELs dzielą się oraz różnicują w komórki należące do wszystkich trzech listków zarodkowych - kardiomiocytów (mezoderma), różnych rodzajów komórek nerwowych (ektoderma) oraz komórek trzustki produkujących insulinę (endoderma) [37]. Ważnym wyzwaniem jest opracowanie takich warunków hodowlanych, które zapewnią ekspansję VSELs, z zachowaniem ich pierwotnego charakteru, czyli bez jednoczesnego, spontanicznego różnicowania w komórki różnych tkanek.

Istotne znaczenie w tym kierunku ma nasza obserwacja, że w hodowli z mysimi komórkami linii mioblastycznej C2C12, około 5-10% VSELs tworzy sfery przypominające ciała embrionalne. Komórki znajdujące się w takich sferach wykazują obecność płodowej formy fosfatazy alkalicznej [37]. W trakcie prowadzonych badań stwierdziliśmy, że komórki w sferach pochodzących z VSELs wykazują cechy komórek niedojrzałych – np. zawierają

duże jądra komórkowe wypełnione euchromatyną. Podobnie jak same VSELS, komórki izolowane ze sfer utrzymują fenotyp antygenowy CXCR4<sup>+</sup>SSEA-1<sup>+</sup>Oct-4<sup>+</sup>. Co więcej, komórki te utrzymują potencjał do odtwarzania nowych sfer w trakcie kolejnych 5-7 pasażów podczas hodowli z komórkami C2C12. Jednocześnie, jeśli zostaną one wyizolowane i umieszczone w odpowiednim medium różnicującym, różnicują się one w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. W miarę wzrastającej liczby pasażów, sfery stają się jednak coraz mniejsze. Obecnie nasza grupa pracuje również intensywnie nad zbadaniem potencjału regeneracyjnego komórek, pochodzących ze wspomnianych sfer, w różnych zwierzęcych modelach uszkodzenia tkanek *in vivo*.

## Perspektywy

Na podstawie wyników badań własnych, jak również wzrastającej liczby doniesień w literaturze, które potwierdzają obecność różnych populacji prymitywnych komórek w szpiku kostnym (m.in. pluripotencjalnych VSELS), uważamy, że pozytywne wyniki wcześniejszych badań sugerujące plastyczność KKM szpiku kostnego, powinny być poddane weryfikacji. Pozostaje również pytanie, czy pluripotencjalne komórki macierzyste, jakimi są VSELS, mogą uczestniczyć w czasie dorosłego życia organizmu w odnowie innych, liniowo zdeterminowanych komórek macierzystych, włączając najliczniejsze w szpiku kostnym KKM.

Stosując odpowiednie modele uszkodzeń narządów u zwierząt, poszukujemy odpowiedzi na pytanie czy VSELS znajdują faktycznie praktyczne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Pierwszym, potencjalnym ograniczeniem ich wykorzystania dla celów terapeutycznych jest stosunkowo niska liczba tych komórek w dorosłym szpiku kostnym (1 komórka VSEL na 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> komórek jednojądrowych szpiku kostnego). Co więcej, z naszych obserwacji wynika, że liczba VSEL-SC jest wyższa u młodych osobników i maleje wraz z wiekiem [36].

Istnieje również możliwość, że VSELS uwolnione ze szpiku po uszkodzeniu tkanek nawet jeśli docierają bez przeszkód do uszkodzonego narządu uczestniczą jedynie w regeneracji niewielkich uszkodzeń. Pojawia się tym samym uzasadniona obawa, że efektywna regeneracja większego uszkodzenia tkankowego (np. zawału mięśnia sercowego, czy też udaru mózgu) może przekraczać zdolności regeneracyjne tych stosunkowo rzadkich komórek. Dlatego tak ważne jest opracowanie protokołów służących do skutecznej ekspansji tych komórek. Po drugie, przemieszczenie VSELS do tkanek objętych uszkodzeniem, zależy od ukierunkowanych sygnałów chemotaktycznych, które mogą być niewystarczająco silne ze względu na obecność enzymów proteolitycznych, wydzielanych przez leukocyty krwi obwodowej i makrofagi tkankowe w miejscach uszkodzenia – które to degradują wydzielane przez uszkodzone tkanki chemoatraktanty dla VSELS.

Przykładowo, metaloproteinazy trawiące białka macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielane przez komórki towarzyszące procesom zapalnym, odpowiadają m.in. za lokalną degradację czynnika chemotaktycznego pochodzenia stromalnego (*stromal derived factor-1* – SDF-1) w uszkodzonych narządach, co w efekcie upośledza migrację komórek macierzystych do miejsc uszkodzenia. W takiej sytuacji zmobilizowane VSELS mogą potencjalnie krążyć w krwi obwodowej, jako „bezdonna” populacja, a następnie wracać do szpiku kostnego lub zasiedlać inne

organy. Po trzecie, aby VSELS mogły w pełni wykazać swój potencjał regeneracyjny, muszą być również w pełni funkcjonalne. Nie można wykluczyć możliwości, że VSELS rezydujące w szpiku kostnym, są funkcjonalnie „zablokowane”, pozostając w stadium swoistego „uśpienia”, wymagając odpowiednich sygnałów aktywacyjnych, których na razie jeszcze nie znamy.

Warto również nadmienić, że nie udało nam się jeszcze zidentyfikować kombinacji czynników wzrostowych, ani także molekuł adhezyjnych, pozwalających na efektywne namnażanie VSELS *in vitro*, bez udziału innych komórek (C2C12, fibroblasty szpikowe). Z drugiej strony jednak, komórki pochodzące ze sfer utworzonych z VSELS mogą różnicować się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych i wykazują od początku znaczny potencjał do samoodnawiania.

Podsumowując wyniki otrzymane w naszym laboratorium wskazują, że VSELS mogą stanowić realną alternatywę dla kontrowersyjnych macierzystych komórek embrionalnych, pozyskiwanych np. drogą tzw. klonowania terapeutycznego. W czasie kiedy trwa etycznie-religijna debata nad zastosowaniem komórek embrionalnych w klinice, istnieje uzasadniona potrzeba zbadania potencjału terapeutycznego VSELS, jako alternatywnego źródła komórek do terapii. Musimy więc jak najszybciej znaleźć odpowiedź na pytanie, czy izolowane z tkanek dorosłych osobników VSELS, mogą być efektywnie zastosowane w klinice. Nadchodzące lata z pewnością przyniosą ważne odpowiedzi na postawione pytania.

## Finansowane z grantu KBN 2PO5A 00429

**Praca zgłoszona na XXX Jubileuszowy Kongres Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego „Jakość życia kobiety – Salus feminae suprema lex esto” w dniach 16-19 września 2009 roku w Lublinie**

## Piśmiennictwo

1. Dądzalska E. Krew pepowinowa – aktualny przegląd możliwości terapeutycznych. *Ginekol Pol.* 2004, 75, supl, 49-52.
2. Orlie D, Kajstura J, Chimenti S, [et al.]. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001, 410, 701-705.
3. Jackson K, Majka S, Wang H, [et al.]. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001, 107, 1395-1402.
4. Brazelton T, Rossi F, Keshet G, [et al.]. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000, 290, 1775-1779.
5. Mezey E, Chandross K, Harta G, [et al.]. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science.* 2000, 290, 1779-1782.
6. Zhao L, Duan W, Reyes M, [et al.]. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002, 174, 11-20.
7. Koshizuka S, Okada S, Okawa A, [et al.]. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004, 63, 64-72.
8. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, [et al.]. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 2000, 6, 1229-1234.

## Konsekwencje fizjologiczne i patologiczne występowania komórek linii zarodkowych

9. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, [et al.]. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. *J Cell Mol Med.* 2004, 8, 329-337.
10. Wagers A, Sherwood R, Christensen J, [et al.]. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science.* 2002, 297, 2256-2259.
11. Balsam L, Wagers A, Christensen J, [et al.]. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004, 428, 668-673.
12. Murry C, Soonpaa M, Reinecke H, [et al.]. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004, 428, 664-668.
13. Castro R, Jackson K, Goodell M, [et al.]. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science.* 2002, 297, 1299.
14. Holden C, Vogel G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science.* 2002, 296, 2126-2129.
15. Cerny J, Quesenberry P. Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol.* 2004, 201, 1-16.
16. Morshead C, Benveniste P, Iscove N, [et al.]. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med.* 2002, 8, 268-273.
17. Ishikawa F, Shimazu H, Shultz L, [et al.]. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J.* 2006, 20, 950-952.
18. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, [et al.]. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003, 422, 897-901.
19. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo J, [et al.]. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003, 425, 968-973.
20. Terada N, Hamazaki T, Oka M, [et al.]. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002, 416, 542-545.
21. Ying Q, Nichols J, Evans E, [et al.]. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002, 416, 545-548.
22. Harris R, Herzog E, Bruscia E, [et al.]. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science.* 2004, 305, 90-93.
23. Jang Y, Sharkis S. Metamorphosis from bone marrow derived primitive stem cells to functional liver cells. *Cell Cycle.* 2004, 3, 980-982.
24. Wurmser A, Nakashima K, Summers R, [et al.]. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature.* 2004, 430, 350-356.
25. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003, 9, 702-712.
26. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, [et al.]. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006, 20, 1487-1495.
27. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, [et al.]. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006, 20, 847-856.
28. Aliotta J, Sanchez-Guijo F, Dooner G, [et al.]. Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production and Engraftment into Lung by Lung-derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation. *Stem Cells.* 2007, 25, 2245-2256.
29. Quesenberry P, Colvin G, Dooner G, [et al.]. The stem cell continuum: cell cycle, injury, and phenotype lability. *Ann N Y Acad Sci.* 2007, 1106, 20-29.
30. Morel O, Toti F, Hugel B, [et al.]. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004, 11, 156-164.
31. VanWijk M, VanBavel E, Sturk A, [et al.]. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003, 59, 277-287.
32. Cherian P, Hankey G, Eikelboom J, [et al.]. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke.* 2003, 34, 2132-2137.
33. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak M. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous—that is the question. *Exp Hematol.* 2005, 33, 613-623.
34. Kucia M, Reca R, Jala V, [et al.]. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2005, 19, 1118-1127.
35. Kucia M, Ratajczak J, Reca R, [et al.]. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis.* 2004, 32, 52-57.
36. Ratajczak M, Kucia M, Reca R, [et al.]. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells "hide out" in the bone marrow. *Leukemia.* 2004, 18, 29-40.
37. Kucia M, Reca R, Campbell F, [et al.]. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia.* 2006, 20, 857-869.
38. Kucia M, Jankowski K, Reca R, [et al.]. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol.* 2004, 35, 233-245.
39. Ratajczak M, Zuba-Surma E, Kucia M, [et al.]. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* 2006, 20, 1915-1924.
40. Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, [et al.]. Identification of Very Small Embryonic Like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res.* 2007, 2008, 331, 125-134.
41. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, [et al.]. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia.* 2007, 21, 297-303.
42. Ratajczak M, Machalinski B, Wojakowski W, [et al.]. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia.* 2007, 21, 860-867.
43. Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* 2007, 109, 1298-1306.
44. Pallante B, Duignan I, Okin D, [et al.]. Bone marrow Oct3/4+ cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2007, 100, e1-e11.
45. Dyce P, Zhu H, Craig J, [et al.]. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 316, 651-658.
46. Yu H, Fang D, Kumar S, [et al.]. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol.* 2006, 168, 1879-1888.
47. Ling T, Kuo M, Li C, [et al.]. Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103, 9530-9535.
48. Mendez-Ferrer S, Prat S, Lukic A, [et al.]. ES-like cells in the adult murine heart. *Fourth ISSCR Annual Meeting*, June 2006, Toronto.
49. Danner S, Kajahn J, Geismann C, [et al.]. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13, 11-20.
50. Kruse C, Kajahn J, Petschnik A, [et al.]. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat.* 2006, 188, 503-517.
51. Guan K, Nayernia K, Maier L, [et al.]. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 2006, 440, 1199-1203.
52. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, [et al.]. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* 2004, 119, 1001-1012.
53. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, [et al.]. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006, 184, 105-116.
54. Koso H, Ouchi Y, Tabata Y, [et al.]. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol.* 2006, 292, 265-276.
55. Stojko R, Witek A, [et al.]. Krew pepowinowa - doskonałe źródło komórek macierzystych? *Ginekol Pol.* 2005; 76, 496-497.
56. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui M, [et al.]. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007, 25, 100-106.
57. Kucia M, Wu W, Ratajczak M. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: Their developmental origin and biological significance. *Dev Dyn.* 2007, 236, 3309-3320.