

*Mariusz Z. Ratajczak*

*Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie*

## Komórki macierzyste i ich potencjalne wykorzystanie w klinice

### STEM CELLS AND THEIR POTENTIAL USE IN A CLINIC

Thanks to the progress in science the man of the beginnings of the third millennium uses the technologies which have been reserved for the highest entities. The development of physics has resulted in discovering many mysteries of nuclear physics and the development of biology and genetics has enriched man's knowledge of the origins of living organisms and their regeneration. As a result, mankind has been introduced in the fascinating world of stem cells.

**Key words:** stem cells, regenerative medicine

### Wstęp

Dzięki postępom nauki człowiek sięgnął u progu trzeciego tysiąclecia po technologie, które do tej pory były przypisywane istotom najwyższym. Rozwój fizyki doprowadził do zgłębienia tajemnic energii jądrowej, rozwój nauk biologicznych i genetyki przybliżył z kolei tajemnice powstawania organizmów i ich regeneracji, wprowadzając tym samym ludzkość w fascynujący świat komórek macierzystych.

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, a tym samym jest odpowiedzialna za odnawianie zużywających się z czasem komórek somatycznych oraz za regenerację narządów i tkanek. Z tego powodu komórkom macierzystym poświęca się coraz więcej uwagi i uważa się, 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, ukierunkowanych dla danego narządu, które będą miały za zadanie regenerację/odbudowę uszkodzonych organów. Szczególne nadzieje na wykorzystanie terapeutyczne komórek macierzystych wiąże się z takimi schorzeniami, jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, parkinsonizm, cukrzyca, dystrofie mięśniowe, toksyczne uszkodzenia wątroby i nerek. Wydaje się, że człowiek faktycznie zaczyna sięgać coraz bardziej po upragniony klucz do długowieczności.

## Komórki macierzyste – definicja, hierarchia i różnorodność

Najbardziej charakterystyczną cechą komórki macierzystej jest jej zdolność do samoodnawiania i różnicowania się w coraz to bardziej ukierunkowane narządowo komórki potomne. Stąd też w przedziale komórek macierzystych istnieje duży stopień hierarchii i zróżnicowania od tych najbardziej prymitywnych rozwojowo do bardziej już ukierunkowanych tkankowo/narządowo (Tabela 1). Dorosły ssak rozwija się z najwcześniejszej komórki macierzystej, jaką jest zapłodniona komórka jajowa (zygota). Zygota jest komórką macierzystą totipotencjalną (KMT). Komórka taka zgodnie z definicją daje początek zarówno komórkom łożyska jak i zarodka. Zygota jako KMT po implantacji w macicy może więc dać początek nowemu osobnikowi. KMT na pierwszych etapach rozwoju embrionalnego różnicuje się natychmiast w komórki macierzyste pluripotencjalne (PKM), które występują m.in. w moruli (stadium zarodka składające się z około 30 komórek) oraz następnie w węzle zarodkowym blastocysty (blastocysta składa się z około 250 komórek). PKM nie mogą odtworzyć łożyska, ale dają początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, mezodermy i endodermy) i mogą różnicować się w tzw.

ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste (UTKM). UTKM ze względu już na ograniczoną możliwość różnicowania do jednego rodzaju tkanki zwane też są komórkami macierzystymi monopotentnymi.

Obliczono, że z zapłodnionej zygoty (KMT) po około 47 podziałach powstaje podczas rozwoju embrionalnego łącznie około  $10 \times 10^5$  komórek należących do dwustu różnych rodzajów komórek tworzących tkanki i organy ciała człowieka. Komórki macierzyste „pracują” ciężko przez całe życie osobnicze i w wyniku zsynchronizowanych procesów samoodnawiania i różnicowania komórek macierzystych rozwija się i funkcjonuje przez wiele lat dorosły, ciągle regenerujący się organizm. Wiadomo bowiem, że nabłonek jelitowy wymienia się co 48, godzin, naskórek co 14 dni, granulocyty co tydzień, a erytrocyty mają okres półtrwania sto – sto pięćdziesiąt dni. W innych narządach i tkankach wymiana zużywanych komórek jest wolniejsza, niemniej istnieją dzisiaj dowody, że nawet takie narządy, jak serce czy mózg wykazują powolną odnowę biologiczną. Trudno sobie bowiem wyobrazić, aby pojedyncza komórka w narządzie mogła żyć przez osiemdziesiąt lat.

Biorąc pod uwagę ogromny potencjał komórek macierzystych i uwzględniając, jak ważną rolę odgrywają one w codziennej regeneracji szeregu tkanek (m.in. tkanki krwiotwórczej, naskórka czy nabłonka jelitowego), nie powinno dziwić, że komórki te stały się przedmiotem żywego zainteresowania klinicystów. Słusznie upatruje się w nich klucz do poprawienia jakości oraz przedłużenia życia ludzkiego.

## Potencjalne źródła komórek macierzystych do regeneracji tkankowo/narządowej

Koncepcja wykorzystania komórek macierzystych w klinice pojawiła się najpierw w hematologii. Od około czterdziestu lat wykorzystuje się bowiem krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM), które zgodnie z podaną powyżej definicją należą do przedziału UTKM dla krwiotworzenia, w leczeniu szeregu chorób układu krwiotwórczego. Coraz częściej stosuje się również UTKM naskórka w leczeniu oparzeń skóry lub dla usprawnienia procesu gojenia się owrzodzeń troficznych kończyn. Zaawansowana jest również technologia pozyskiwania fibroblastów szpiku kostnego – tzw. macierzystych komórek mesenchymalnych, które można uważać za UTKM dla tkanki łącznej, służące w leczeniu ubytków kostnych. Wspólną cechą komórek macierzystych krwiotwórczych, naskórka czy mesenchymalnych jest stosunkowo duża łatwość ich pozyskiwania. Przeciwnie, ze zrozumiiałych 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 pojawiły się koncepcje wykorzystania bardziej prymitywnych PKM, które jak wspomniano powyżej mają zdolność różnicowania się we wszystkie komórki zarodka – będąc tym samym źródłem UTKM. Wykorzystanie PKM w medycynie klinicznej wzbudziło na świecie spore nadzieje na rozwój nowych metod leczniczych, ale jednocześnie spowodowało szereg dyskusji i emocji natury religijno-etycznej. Problem wykorzystania tych komórek jest różnie postrzegany przez różne religie, gdyż dotyka problemu początku życia człowieka, który jest różnie interpretowany przez różne główne religie świata. Próbując otrzymać wczesno rozwojowe PKM, zbliżamy się bowiem bardzo blisko do TKM, a więc do komórki macierzystej, która może rozwinąć się w dorosłego osobnika. W ten sposób nauka dotyka dogmatów na jakim etapie embriogenezy zaczyna się życie.

## Embrionalne i nieembrionalne źródła komórek macierzystych

PKM mogą być potencjalnie pozyskiwane z czterech różnych źródeł, które wymieniono w Tabeli 1. Każde z tych potencjalnych źródeł ma swoje zalety, jak i ograniczenia, które zostaną pokrótce przedstawione poniżej. Omówimy zarówno kontrowersyjne źródła PKM pochodzących z zarodków, jak i otrzymywanych z dorosłych tkanek. Takie szersze przedstawienie problemu może być pomocne w zrozumieniu zjawisk, o których często wypowiadają się osoby, którym brak jest wiedzy biologicznej, nie wiedzące, co kryje się pod konkretnymi pojęciami. Dlatego też nie będziemy unikać trudnych i drażliwych tematów, wierząc że każdy musi sam dokonać wyboru zgodnie z własnym sumieniem i osobistym światopoglądem, jakie są potencjalne granice wykorzystania różnych źródeł komórek macierzystych w medycynie.

### Pluripotencjalne komórki macierzyste izolowane z zarodków (embrionalne)

Wiadomo, że tkanki zarodkowe są potencjalnym źródłem PKM. Komórki takie można pozyskać z rozwijającej się moruli lub blastocysty (Rycina 1), wykorzystując np. zamrożone wczesne „nadliczbowe” morule przechowywane w klinikach, gdzie wykonuje się zapłodnienia *in vitro*. Wykorzystując takie zarodki, uzyskano pierwsze ustalone

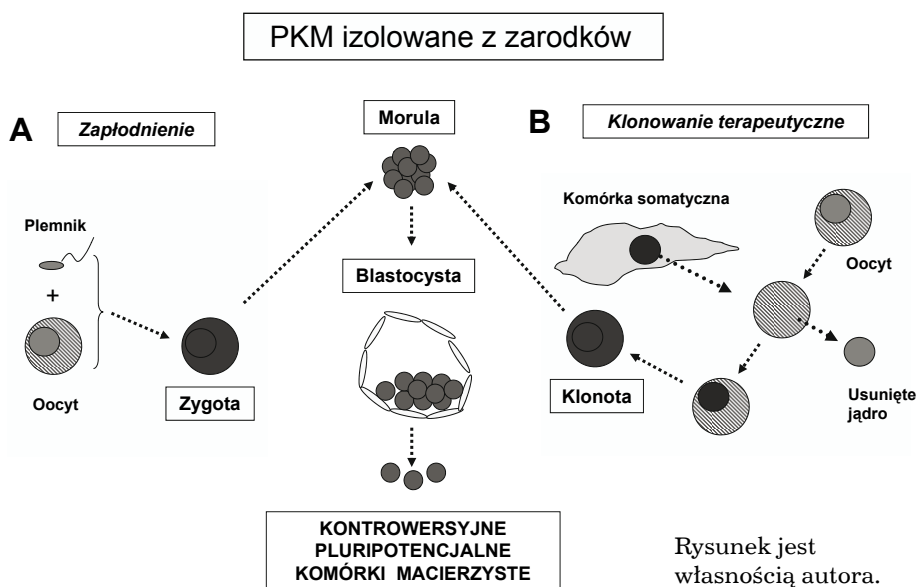
ludzkie linie komórek embrionalnych. Zgodnie z dekretem prezydenta Georga Busha, jeśli były one otrzymane przed 9.08.2001 roku, mogły być legalnie wykorzystane do badań finansowanych z funduszy federalnych. Jeśli otrzymane były „minutę” po północy z 9 na 10.08.2001 roku, tego prawa już się nie stosowało. Była to oczywiście sztucznie ustalona granica, która nie rozwiązywała tego problemu. Szybko jednak okazało się, że wiele z około sześćdziesięciu ludzkich linii, na których zezwolono badania jest mało przydatnych. Linie te bowiem szybko zmieniały właściwości w hodowlach *in vitro*.

Tabela 1. Hierarchia komórek macierzystych (KM)

|   |   |
|---|---|
| <b>Totipotencjalne KM (KMT)</b>   | Dają początek zarówno ciału zarodka, jak i tkankom łożyska. W warunkach naturalnych totipotencjalnymi komórkami są zapłodniony oocyt (zygota) oraz pierwsze blastomery. W warunkach sztucznych totipotencję zachowuje odpowiednik zygoty – tzw. <i>klonota</i> , powstały na skutek transferu jądra komórki somatycznej do oocytu ( <i>ang. nuclear transfer</i> ). |
| <b>Pluripotencjalne KM (PKM)</b>  | Dają początek komórkom wszystkich trzech listków zarodkowych po przeszczepieniu do rozwijającej się blastocysty. Pluripotencjalnymi są komórki wewnętrznej masy blastocysty oraz epiblastu.   |
| <b>Monopotencjalne KM lub ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste (UTKM)</b> | Obejmują tzw. komórki ukierunkowane tkankowo, dające początek komórkom tylko jednej linii. Należą tu m.in. KM nabłonka jelit, krwiotwórcze KM, KM naskórka, KM nerwowe, KM wątroby oraz KM mięśni szkieletowych.  |

Źródło PKM z zarodków pochodzących od dawców do potencjalnych terapii budzi jednak również sporo zastrzeżeń natury naukowej. Zarodki takie, jak wiadomo, są tkankowo odmienne od potencjalnego biorcy komórek. W związku z powyższym ustalone linie komórek embrionalnych będą różnicowały się w komórki, które będą posiadały inny zestaw antygenów układu zgodności tkankowej niż potencjalny biorca. Będą więc rozpoznawane przez układ immunologiczny biorcy jako całkowicie obce, gdyż zarodek pochodził od niezgodnego w układzie HLA dawcy. Ponadto, trudno sobie wyobrazić, biorąc pod uwagę względy etyczne, jak i techniczne (dostęp do komórek rozrodczych rodziców), że otrzymywałoby się takie zarodki dla konkretnego pacjenta „na zamówienie” od biologicznych rodziców. Badania u zwierząt

doświadczalnych wykazały ponadto, że podanie komórek ustalonych linii embrionalnych powoduje u nich powstawanie potworniaków. Nierealne wydaje się również pozyskiwanie pojedynczych blastomów pozyskanych drogą mikrobiopsji wczesnej moruli, jak to zostało ostatnio zaproponowane przez jeden z zespołów badawczych. Dlatego też pozyskiwanie PKM dla celów klinicznych z normalnych ludzkich zarodków zostało słusznie zarzucone. Pozostał niemniej jednak dylemat, co zrobić z zamrożonymi w bankach na świecie zarodkami: trzymać je w nieskończoność w stanie hibernacji, rozmrozić i zniszczyć czy też wykorzystać do badań podstawowych.



Rycina 1. **PKM pozyskiwane z zarodków.** Panel A – PKM obdarzone właściwościami różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych pozyskuje się poprzez ekspansję PKM izolowanych z węzła zarodkowego blastocysty. Blastocystę można otrzymać *in vitro* z moruli, która powstaje z zygoty drogą zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik *in vitro*. Panel B – PKM można również pozyskać na drodze tzw. klonowania terapeutycznego, podczas którego zamiast zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik, wprowadza się do cytoplazmy enukleowanej uprzednio komórki jajowej jądro dojrzałej komórki somatycznej (np. fibroblastu). W wyniku tego procesu zwanego jako „przeniesienie jądra” (ang. *nuclear transfer*) powstaje klonota, która podobnie jak zygota może dać początek moruli, a potem blastocysty. Warto nadmienić, że zarówno zygota, jak i klonota, jeśli zostaną umieszczone w macicy, utworzą dojrzałego osobnika. Jeśli osobnik taki powstaje z klonoty, mówimy o tzw. klonowaniu

reprodukcyjnym. Zastosowanie tego typu strategii w wypadku człowieka budzi szereg zastrzeżeń natury etycznej. Jednak jak do tej pory nie udało się jeszcze na szczęście otrzymać ludzkiej klonoty.

### Pluripotencjalne komórki macierzyste uzyskiwane w wyniku tzw. klonowania terapeutycznego

Biorąc pod uwagę aspekty natury etycznej, jak i problemy techniczne w pozyskiwaniu normalnych ludzkich zarodków oraz świadomość, że PKM otrzymywane z takich zarodków będą różnicowały się w niezgodne tkankowo z biorcą tkanki, opracowano strategię pozyskiwania PKM z wczesnych zarodków tworzonych w laboratorium w wyniku tzw. klonowania terapeutycznego (Tabela 2).

Tabela 2. Różne potencjalne źródła pluripotencjalnych komórek macierzystych (PKM).

|   | <b>PKM izolowane z bankowanych zarodków otrzymanych drogą zapłodnienia</b> | <b>PKM izolowane z zarodków otrzymanych poprzez utworzenie klonoty (klonowanie terapeutyczne)</b> | <b>PKM izolowane z dorosłych tkanek (np. VSELs)</b> | <b>PKM uzyskane w wyniku transformacji komórek somatycznych (indukowane PKM)</b> |
|---|--|---|---|--|
| Ryzyko powstania guzów nowotworowych – potworniaków | +  | +   | –   | +  |
| Problem niezgodności tkankowej                      | +  | –   | –   | +/-  |
| Wymagany dawca komórki jajowej                      | +  | +   | –   | –  |
| Zastrzeżenia natury etycznej                        | Tak !!!  | Tak/Nie*  | Nie   | Nie  |

\* Problem różnie postrzegany przez różne główne religie światowe. Szereg religii potencjalnie akceptuje klonowanie terapeutyczne (np. islam, buddyzm, judaizm), ale zdecydowana większość odrzuca klonowanie reprodukcyjne.

Strategia klonowania terapeutycznego polega na utworzeniu *in vitro* komórki, która jest równa pod względem potencjału rozwojowego zygocie. Komórka taka zwana jest klonotą (Rycina 1). Podczas tworzenia klonoty wykorzystuje się „jako inkubator biochemiczny” cytoplazmę komórki jajowej, z której uprzednio usuwa się jądro posiadające połowę (haploidalną liczbę) chromosomów. Do pozbawionej jądra komórki jajowej wprowadza się następnie jądro dojrzałej komórki somatycznej (np. jądro fibroblastu lub limfocyty), która posiada pełen diploidalny garnitur chromosomalny. Proces ten różni się od zapłodnienia tym, że w przeciwieństwie do zapłodnienia nie występuje tutaj połączenie haploidalnej liczby chromosomów matki i haploidalnej liczby chromosomów ojca w unikalny diploidalny zestaw genów. W przeciwieństwie, wszystkie chromosomy (zestaw diploidalny), w tym i geny zgodności tkankowej, pochodzą z komórki dawcy jądra.

Po przeniesieniu jądra somatycznego do cytoplazmy komórki jajowej, wprowadzone chromosomy ulegają „odróżnicowaniu”. Jak wspomniano, cytoplazma komórki jajowej jest unikalnym inkubatorem biochemicznym zawierającym szereg enzymów mogących modyfikować DNA. Ogólnie ujmując, proces ten polega na procesach demetylacji DNA oraz odpowiedniej rearanzacji i ustaleniu odpowiedniego wzoru metylacji i acetylacji białek histonowych. Wszystko to prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny i powrotu zróżnicowanego już rozwojowo DNA z komórki somatycznej dawcy do stanu, jaki miało ono w zapłodnionej komórce jajowej. Umożliwia to ekspresję wczesnych rozwojowo genów.

Powstaje tym samym klonota, będąca sztucznie stworzonym rodzajem KMT, która w odróżnieniu od zygoty posiada zestaw chromosomów – tym samym geny kodujące układ zgodności tkankowej, zgodny z komórką, od której pochodziło jądro. Strategia ta znana jako przeniesienie jądra komórkowego do komórki jajowej (ang. *nuclear transfer*), jest ciągle jeszcze jednak w stadium eksperymentalnym w modelach zwierzęcych u ssaków. Jak wiadomo, ostatni głośny skandal w Korei wykazał, że wbrew wcześniejszym doniesieniom nie udało się do tej pory nikomu jeszcze otrzymać ludzkiej klonoty.

Należy nadmienić, że szereg emocji natury etycznej budzi potencjał rozwojowy klonoty. Jak wspomniano, klonota, podobnie jak zapłodniona komórka jajowa jest komórką totipotencjalną (TKM). W hodowlach *in vitro* może dać początek moruli i blastuli, z których można pozyskać PKM, podobnie jak to próbowano czynić z zarodków rozwijających się w wyniku fizjologicznego zapłodnienia. Strategia pozyskiwania takich komórek z zarodków tworzonych przez klonotę, znana jest



pod nazwą tzw. klonowania terapeutycznego. Z drugiej jednak strony, jeżeli klonotę umieści się w macicy, może ona podobnie jak zygota dać początek nowemu osobnikowi. Powoduje to duże opory natury etycznej, gdyż stwarza podstawy tzw. klonowania reprodukcyjnego. W ten sposób otrzymano np. słynną owcę Dolly. Możliwość klonowania terapeutycznego, jako drogi pozyskania komórek zgodnych z dawcą jądra komórkowego, jest dopuszczana przez niektóre kręgi religijno-kulturowe. Jak jednak wspomniano, należy się cieszyć, że nie udało się do tej pory uzyskać ludzkiej klonoty i pochodzących z niej ludzkich PKM.

Teoretyczna możliwość uzyskania ludzkich PKM na drodze klonowania terapeutycznego spowodowała jednak ostrą krytykę ze strony kręgów kulturowo-religijnych. Postawiono bowiem słuszny zarzut, że zarodek otrzymany z klonoty powinien być traktowany jako istota żywa. W odpowiedzi na te zarzuty zaproponowano szereg modyfikacji pozyskiwania PKM z zarodków. Zgodnie z powyższym, PKM zaczęto pozyskiwać z zarodków uzyskanych w wyniku partenogenezy (omijając proces fizjologicznego zapłodnienia), drogą mikrobiopsji rozwijającej się moruli, uzyskując pojedyncze blastomery, będące materiałem wyjściowym do namnażania PKM czy też tworząc niezdolne rozwojowo zarodki poprzez wprowadzenie tzw. „genu samobójczego”, który uniemożliwia ukończenie pełnej embriogenezy.

Oprócz oporów natury etyczno-religijnej główną przeszkodą szerszego wykorzystania klonowania terapeutycznego okazała się 1) dotychczasowa nieefektywność tej strategii w uzyskaniu ludzkich klonot, 2) potrzeba dostępu do ludzkich komórek jajowych (oocytów) oraz 3) obserwacje, że PKM otrzymane ze zwierzęcych klonot tworzą również, podobnie jak komórki embrionalne u zwierząt doświadczalnych, potworniaki. Co najważniejsze, w międzyczasie pojawiły się inne alternatywne metody pozyskiwania PKM z dorosłych tkanek np. poprzez modyfikację genetyczną komórek izolowanych od pacjentów. Powyższe strategie omówione zostaną poniżej.

### Komórki macierzyste pozyskiwane z dorosłych tkanek

Niejako równolegle z pierwszymi doniesieniami, że możliwe jest pozyskanie ludzkich linii komórek embrionalnych, zaczęto poszukiwać innych alternatywnych źródeł PKM. Poniżej omówię tzw. indukowane PKM (ind-PKM) oraz izolowane z dorosłych tkanek PKM mające markery komórek embrionalnych – tzw. komórki VSELs. Pozyskanie takich komórek było oczekiwane szczególnie z zainteresowaniem

przez oponentów stosowania komórek embrionalnych w medycynie regeneracyjnej.

### Indukowane PKM (ind-PKM)

Innym rodzajem PKM, które zaproponowano ostatnio jako alternatywę dla komórek izolowanych z zarodków są tzw. indukowane PKM (ind-PKM). Komórki te są uzyskiwane w wyniku transformacji hodowlanych *in vitro* dorosłych komórek somatycznych za pomocą genów kodujących czynniki transkrypcyjne kluczowe dla rozwoju komórek embrionalnych (Oct-4, Nanog, Klf4, c-myc). Geny te wprowadzane są do komórki somatycznej (np. komórki fibroblastu) za pomocą wektorów retrowirusowych. W wyniku powyższej strategii można uzyskać transformowaną komórkę, która posiada szereg właściwości PKM (m.in. różnicuje się w komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych).

Transformacja taka jest jednak stosunkowo rzadka, średnio jedna komórka na kilka tysięcy poddanych powyższej manipulacji genetycznej ulega transformacji (indukcji do stanu embrionalnego) i zaczyna proliferować, tworząc klon składający się z ind-PKM. Jest to jednak trudno kontrolowany proces, a komórki uzyskane w wyniku powyższej strategii, podobnie jak komórki embrionalne izolowane z zarodków, tworzą potworniaki w modelach doświadczalnych u zwierząt laboratoryjnych. Wprowadzanie do komórek somatycznych genów indukujących powstanie ind-PKM zaburza ponadto strukturę i organizację DNA, co może potencjalnie prowadzić do indukowania mutacji i powstania komórek nowotworowych.

Obecnie próbuje się uzyskać ind-PKM, ograniczając liczbę wprowadzonych genów (np. transformując komórki tylko za pomocą pojedynczego genu Oct-4) oraz próbując zastąpić wprowadzane geny pewnymi niskocząsteczkowymi molekułami, które bezpośrednio mogą „odróżnicowywać” DNA w komórkach somatycznych. Wydaje się, że jest to bardziej obiecująca strategia pozyskiwania ind-PKM w porównaniu z transformacją komórek za pomocą wprowadzanych genów w niekontrolowany sposób do chromosomów.

Przyjmuje się, że ind-PKM są alternatywą komórek pozyskiwanych z zarodków m.in. również tych otrzymywanych na drodze klonowania terapeutycznego. Tak więc, kontrowersyjny problem wykorzystania komórek z zarodków niejako rozwiązuje się na naszych oczach pod postacią ind-PKM. Otrzymanie ind-PKM nie wymaga dostępu do ludzkich komórek jajowych, a co najważniejsze komórki powstające z ind-PKM, podobnie jak te otrzymywane drogą klonowania

terapeutycznego, będą posiadały te same geny kodujące układ zgodności tkankowej jak potencjalny biorca. Mogłyby być wykorzystane w klinice bez ryzyka odrzucenia powstających z nich tkanek. Co najważniejsze, o ile strategia klonowania terapeutycznego nie powiodła się jak do tej pory w przypadku komórek człowieka, otrzymano już szereg ludzkich linii komórek ind-PKM.

Należy jednak nadmienić, że ind-PKM niestety również powodują powstawanie potworniaków i są odrzucane przez organizm biorcy w modelach zwierzęcych. Problem ten musi zostać rozwiązany zanim zastosuje się takie komórki w klinice.

### Komórki pluripotencjalne izolowane z dorosłych tkanek – komórki VSELs

Kilka lat temu zaproponowano teorię tzw. „plastyczności komórek macierzystych” lub ich zdolności do „transróżnicowania”. Zgodnie z tą teorią UTKM np. 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. Ogromne nadzieje pokładano w potencjalnym zastosowaniu KKM izolowanych ze szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, w terapiach regeneracyjnych uszkodzonych narządów i tkanek. Szereg artykułów naukowych, opublikowanych w najlepszych pismach naukowych sugerowało 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.

Pomimo przytoczonych powyżej obiecujących wyników, rola szpiku kostnego oraz zawartych w nim KKM, w regeneracji uszkodzonych narządów budziła jednak od początku kontrowersje. 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. Te nieoczekiwane obserwacje podważyły koncepcje plastyczności KKM. Część uzyskanych poprzednio pozytywnych wyników zaczęto tłumaczyć poprzez fenomen fuzji komórkowej. Według tej teorii, przeszczepiane KKM, mogłyby ulegać fuzji (stopieniu) z komórkami uszkodzonych narządów. Tak więc komórki w uszkodzonych narządach, leczonych przeszczepionymi KKM, były wtedy heterokarionami powstałymi na skutek fuzji

przeszczepionych KKM oraz komórek należących do uszkodzonego narządu. Warto nadmienić jednak, że fuzja komórkowa należy jednak do bardzo rzadkich, przypadkowych zjawisk i nie może w pełni tłumaczyć opublikowanych, pozytywnych wyników badań wskazujących udział komórek izolowanych z dorosłych tkanek w regeneracji. Zaczęto więc poszukiwać innego wytłumaczenia „zjawiska plastyczności” komórek macierzystych.

Ostatnie doniesienia wskazały m.in. 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 (ang. microvesicles). Mikrofragmenty komórkowe są kulistymi strukturami, w których fragment cytoplazmy komórkowej jest otoczony błoną komórkową. 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. 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, co wydaje się jednak najbardziej logicznym wytłumaczeniem wyjaśniającym pozytywne wyniki wykazujące „plastyczność” KKM oraz udział komórek szpikowych w regeneracji uszkodzonych narządów.

Od początku badań nad plastycznością nie wzięto poważnie pod uwagę możliwości, że szpik kostny zawiera heterogenną populację komórek macierzystych. Dlatego, 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. Zgodnie z powyższym, najlepszym wyjaśnieniem zjawiska plastyczności KKM wydaje się fakt obecności heterogennej populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej, których to udział w regeneracji uszkodzonych tkanek może tłumaczyć opisywane zjawiska „plastyczności i transróżnicowania” KKM. Tak więc, fakt występowania wczesnych rozwojowo niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym, krwi obwodowej lub pępowinowej może wyjaśnić bardziej wiarygodnie niż transróżnicowanie KKM pozytywne wyniki „plastyczności”.

Rozpoczęto więc poszukiwania takich komórek w szpiku kostnym, krwi pępowinowej i mobilizowanej krwi obwodowej. Planem tych poszukiwań było zidentyfikowanie m.in. populacji tzw. małych komórek embrionalno podobnych komórek macierzystych (**ang. *very small embryonic-like stem cells – VSELs***).

Wykazano, że komórki te są zdeponowane w tkankach podczas rozwoju embrionalnego jako populacja PKM i źródło dla bardziej zróżnicowanych UTKM. Stanowią one jednak bardzo rzadką populację komórek np. w dorosłym szpiku kostnym ok. jedna komórka VSEL przypada na  $10^4$ - $10^5$  komórek jednojądrowych. Wykazano również, że szpik kostny, jak inne tkanki młodych osobników zawiera więcej komórek o fenotypie VSELs i liczba tych komórek maleje z wiekiem. Wiadomo, że komórki te pojawiają się w krwi obwodowej w stanach uszkodzeń narządowych, uwidaczniając niejako naturalny mechanizm organizmu polegający na mobilizacji tych komórek, aby brały udział w próbie regeneracji uszkodzonych tkanek. Myśląc o wykorzystaniu tych komórek do potencjalnych celów terapeutycznych, niezbędnym staje się szybkie opracowanie skutecznej metody ekspansji tych komórek *ex vivo*. Można byłoby również rozważyć strategie lecznicze zwiększające mobilizację tych komórek do krwi obwodowej za pomocą środków farmakologicznych. Lekiem, który skutecznie mobilizuje komórki szpiku kostnego, w tym również VSELs jest czynnik wzrostowy pochodzenia granulocytów (**ang. *granulocyte colony stimulating factor – G-CSF***).

Wyniki otrzymane w naszym laboratorium wskazują jednak, że VSELs mogą stanowić realną alternatywę dla komórek pozyskiwanych np. drogą tzw. klonowania terapeutycznego czy ind-PKM. W czasie, kiedy trwa etyczno-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.

**Słowa kluczowe:** komórki macierzyste, medycyna regeneracyjna, klonowanie terapeutyczne