

KRÓTKI PRZEGLĄD NA TEMAT KOMÓRKEK MACIERZYSTYCH

A SHORT OVERVIEW OF STEM CELLS

Barbara Kmieciak^{1*}, Anna Skotny-Krakowian², Zbigniew Rybak³

¹ Politechnika Wroclawska, Wydział Mechaniczny,
Katedra Mechaniki i Inżynierii Materiałowej, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

² Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Klinika Chorób
Wewnętrznych Geriatrii i Alergologii, 50-369 Wrocław, ul. Skłodowskiej-Curie 66

³ Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Zakład Chirurgii
Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, 50-326 Wrocław, ul. Poniatowskiego 2

*e-mail:barbara.kmieciak@pwr.edu.pl

STRESZCZENIE

Wykorzystanie komórek macierzystych może mieć duży potencjał w medycynie. Stale jednak toczą się debaty, jakie rodzaje komórek macierzystych powinny być w przyszłości wykorzystywane w celach regeneracyjnych. W poniższej pracy dokonano porównania embrionalnych, indukowanych pluripotencjalnych i somatycznych komórek macierzystych. Jednak, by bezpiecznie wykorzystywać komórki macierzyste do regeneracji ciała ludzkiego, należy jeszcze dokładniej poznać mechanizmy ich działania. Z tego powodu Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) już w 2006 roku zdecydowała się na opracowanie procedur, które mają zapewnić bezpieczeństwo pacjentom korzystającym z terapii opartych na komórkach macierzystych.

Słowa kluczowe: embrionalne komórki macierzyste, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, mezenchymalne komórki macierzyste

ABSTRACT

Applications of stem cells has a huge medical potential. However, among scientists there is an ongoing debate, concerning which stem cells should be used in the future for regeneration purposes. This paper presents a comparison of embryonic, induced pluripotent, and somatic stem cells. Gaining a better understanding of the molecular functioning of stem cells will probably lead to more efficient treatment methods for many incurable diseases. For this reason, American agency for Food and Drug Administration (FDA) established some general procedures, which, to some degree, should ensure the safety of experimental stem cell therapies.

Keywords: embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, mesenchymal stem cells

1. Wstęp

Komórki macierzyste mają pewne cechy, które znacząco odróżniają je od innych. Pierwszą z nich jest możliwość samoodnowienia poprzez podział komórkowy. Drugą cechą jest umiejętność różnicowania się w komórki wyspecjalizowane. Proces ten zachodzi w specyficznych warunkach fizycznych i chemicznych, które inicjują zmiany prowadzące do powstania komórki wyspecjalizowanej. Komórki macierzyste prawdopodobnie pozwolą leczyć nieuleczalne do tej pory schorzenia takie jak: nowotwory złośliwe (które będą się wiązać z usunięciem całego organu np. nowotwory trzustki), choroba Parkinsona czy cukrzyca typu I.

Za przełomowe na drodze do zrozumienia sposobu działania komórek macierzystych uznaje się badania Japończyka Shinya Yamanaki i Brytyjczyka Johna Gurdon. W 2012 roku zostali oni wyróżnieni Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Swoje eksperymenty zaczęli od bardzo prostych pytań, które stały się tematem przewodnim ich przełomowych odkryć w medycynie. Sir Gurdon na początku swoich badań zastanawiał się, czy genom ulega nieodwracalnym zmianom podczas różnicowania się w wyspecjalizowane komórki. Sprawdził, czy informacja genetyczna wyspecjalizowanej komórki będzie funkcjonować w komórce niezróżnicowanej. Wyniki, jakie otrzymał, sugerowały, że genom komórki specjalistycznej potrafi zainicjować procesy, które prowadzą do cofnięcia zmian zachodzących na drodze różnicowania w materiale genetycznym. Dzięki swoim badaniom opracował metodę zwaną transferem jądra [1].

Natomiast doktor Yamanaka w swoich badaniach wprowadził do mysich komórek embrionalnych i dorosłych fibroblastów retrowirusy zawierające czynniki transkrypcyjne (OCT $\frac{3}{4}$, Sox2, c-Myc i Klf4). Doprowadziło to do powstania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), które są podobne do embrionalnych komórek macierzystych pod względem morfologicznym. Jednakże w wyniku ich proliferacji powstają bardzo często komórki mogące tworzyć bardzo groźne nowotwory zwane potworniakami[2]. Dodatkowo stosowanie embrionalnych komórek macierzystych wiąże się nie tylko z ich niekontrolowanym różnicowaniem się, ale również z dylematami etycznymi.

Obecnie w medycynie regeneracyjnej poszukuje się komórek macierzystych, które:

- a) są dostępne w dużych ilościach,
- b) są uzyskiwane za pomocą metod jak najmniej inwazyjnych.
- c) różnicują się w komórki specjalistyczne w kontrolowany sposób,
- d) mogą być przeszczepiane innym organizmom;
- e) metody pracy przy komórkach macierzystych są zgodne z aktualnymi procedurami.

Takie komórki teoretycznie mogłyby być źródłem komórek do transplantacji [3, 4, 5, 6].

2. Rodzaje i cechy komórek macierzystych

Komórki macierzyste nie mają żadnych specyficzno-tkankowych struktur, które pozwoliłyby na wykonywanie wyspecjalizowanych funkcji (przewodzenie sygnałów elektrochemicznych, pompowanie krwi itp.). Dopiero pewne czynniki mogą doprowadzić do tego, żeby komórki niewyspecjalizowane stały się komórkami wyspecjalizowanymi. Taka umiejętność tworzenia komórek całkowicie innej tkanki nazywana jest plastycznością [4]. Specyficzne czynniki i warunki mogą pozwolić komórkom macierzystym pozostać niewyspecjalizowanymi. Obecnie prowadzone są badania, dzięki którym próbuje się zrozumieć sygnały w badanym organizmie, które doprowadzają do wyspecjalizowania się komórek (do tej pory ustalono, że takim sygnałem jest na pewno informacja o uszkodzonej tkance). Te informacje są jednymi z najbardziej poszukiwanych, ponieważ umożliwiłyby uzyskanie dużej ilości wyspecjalizowanych komórek macierzystych, które pozwoliłyby na wykonywanie następných eksperymentów [4].

Naukowcy są dopiero na początku zrozumienia sygnałów wewnątrz-i zewnątrzkomórkowych, które powodują różnicowanie się komórek macierzystych. Wewnętrzne sygnały są kontrolowane przez geny komórkowe, które przeplatane są długimi nićmi DNA i niosą zakodowane instrukcje dla wszystkich struktur i funkcji komórkowych. Zewnętrzne sygnały, prowadzące do różnicowania się komórki (włączając substancje chemiczne), wydzielane są przez inne struktury biologiczne, przez fizyczny kontakt sąsiadujących komórek i pewne molekuly w mikrośrodoisku [4].

Badania nad potencjałem i biologią komórek macierzystych ciągle trwają. Do tej pory ustalono

niewiele faktów, które umożliwiłyby zrozumienie działania tych struktur biologicznych. Sugeruje się, że na potencjał komórek macierzystych szczególny wpływ ma czas i miejsce pobrania. Prawdopodobnie warunkują to możliwości proliferacyjne oraz drogi różnicowania (p. rys. 1). Potencjał komórek macierzystych zmniejsza się wraz z wiekiem organizmu, ponieważ po jego ukształtowaniu się następuje wyczerpywanie rezerw w celach regeneracyjnych. W okresie płodowym komórki macierzyste mają największe możliwości, ponieważ następują tam procesy kształtujące powstający organizm [6].



Rys. 1. Rodzaje komórek macierzystych wraz z miejscem pobrania (na podstawie [7])

Rozróżnia się trzy podstawowe rodzaje komórek macierzystych: embrionalne komórki macierzyste (ESC, ang. *embryonicstemcell*), indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC) i somatyczne komórki macierzyste (MSC). Szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszyły się ESC i iPSC, które zalicza się do komórek pluripotencjalnych¹. Jednakże są one ograniczone w liczebności i dostępności dla pacjenta (dostępność biologiczna, ograniczenia etyczne). Dodatkowo struktury te, prawdopodobnie charakteryzują się specyficzną immunogeniczną, czyli posiadają antygeny charakterystyczne dla danego organizmu. Niektórzy naukowcy sugerują, że nie można ich stosować w leczeniu pacjentów, ponieważ są one zgodne tkankowo tylko z rozwijającym się zarodkiem, z którego zostały pobrane. Poza tym są to komórki nieśmiertelne typu nowotworowego (komórki w wyniku manipulacji genetycznej stale się dzielą) i istnieje ogromne ryzyko pojawienia się nowotworu u leczonego pacjenta. Natomiast komórki macierzyste dojrzałych tkanek są immunokompatybilne i nie podlegają etycznym rozważaniom. Komórki te utrzymują szeroki potencjał różnicowania, ale ich potencjał rozwojowy jest węższy w porównaniu z komórkami embrionalnymi. Początkowo uważano, że zdolność różnicowania jest ograniczona do tkanki, z której pochodzą (unipotencja²). Ostatnie badania jednak dowodzą, że mogą się różnicować w komórki o tym samym pochodzeniu embrionalnym (multipotencja³), a w odpowiednich warunkach wykazywać także charakter pluripotencjalny. Do rozróżniania rodzajów komórek macierzystych wykorzystuje się markery białek powierzchniowych [6, 7].

Embrionalne komórki macierzyste mają charakter totipotencjalny⁴ i mogą się różnicować do wszystkich typów tkanek. Odgrywają one kluczową rolę w rozwoju człowieka, ponieważ pełnią rolę materiałów, z których powstają wszystkie tkanki i narządy w rozwijającym się zarodku (oraz tkanki pozazarodkowe). Wykształcony organizm również ma komórki macierzyste, które nazywane są dorosłymi (somatycznymi). Można je znaleźć w całym organizmie (szpik kostny, tkanka tłuszczowa, krew obwodowa, mózg, wątroba, skóra, krew płodowa, krew pępowinowa, łożysko). Ich celem jest prawdopodobnie utrzymanie wzrostu oraz naprawa tkanek podczas funkcjonowania organizmu. Są one zobowiązane do regeneracji, która prawdopodobnie nie zachodzi tylko w tkance macierzystej. Wiele badań sugeruje, że mają one możliwość migrowania – w razie potrzeby – do innych tkanek i różnicowania się w komórki specjalistyczne. Wykorzystując tę wiedzę, można pobierać od pacjenta komórki macierzyste, różnicować je w laboratorium i następnie umieszczać je w leczonym miejscu.

¹ Komórki pluripotencjalne – komórki blastocysty, dają początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu, z wyjątkiem komórek łożyska.

² Komórki unipotentne – różnicują się tylko do jednego typu komórek dojrzałych.

³ Komórki multipotentne – mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach i pochodzeniu embrionalnym.

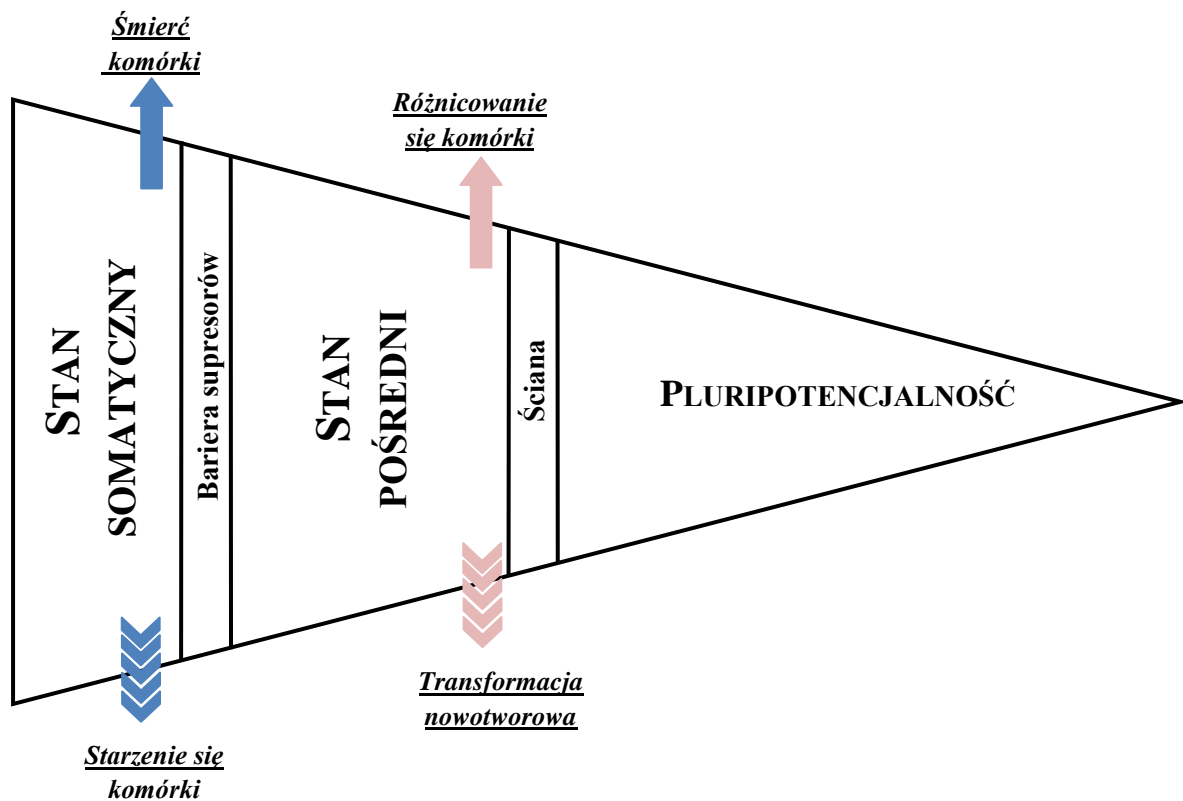
⁴ Komórki totipotentne – blastomery dzielącej się zygoty, mogą się różnicować do każdego typu komórek, łącznie z komórkami tworzącymi łożysko.

W ten sposób omija się potrzebę zażywania przez pacjenta leków immunosupresyjnych. Najczęściej badanym i wykorzystywanym źródłem komórek macierzystych jest szpik kostny. Jednakże ilość tych komórek nie jest duża (stosunek do jednojądrzastych komórek szpiku wynosi od 1:10 000–1 000 000) i zmniejsza się wraz z wiekiem. Najwięcej jest ich u noworodków, a najmniej u osób starszych (powyżej 80. roku życia obniża się o połowę). Jednakże hodowla dorosłych komórek macierzystych nie należy do prostych. Do tej pory nie odkryto takiego źródła komórek macierzystych, które pozwalałoby na pozyskiwanie ich w sposób małoinwazyjny, w dużej liczbie. Dorosłe komórki macierzyste z powodu telomerazy mają ograniczoną liczbę podziałów (w przeciwieństwie do komórek embrionalnych). Z tego powodu sugeruje się, że embrionalne komórki macierzyste są bardziej odpowiednim materiałem dla inżynierii tkankowej [4, 5, 8].

Innym rodzajem komórek macierzystych są indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Pierwszy raz zostały one wyhodowane w roku 2006 z komórek skóry myszy. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste powstały poprzez wprowadzenie za pomocą wektora retrowirusowego do embrionalnych komórek myszy i dorosłych fibroblastów czterech genów: OCT $\frac{3}{4}$, Sox2, c-Myc i Klf4.

OCT $\frac{3}{4}$ i Sox2 pozwalają otrzymać pluripotencjalność, natomiast c-Myc i Klf4 to geny proonkogenne, które są niezbędne do zapoczątkowania tego zjawiska. Prawdopodobnie aktywują one procesy prowadzące do obecności wszystkich niezbędnych czynników pozwalających na stworzenie iPSC. Powstałe komórki wykazują morfologię oraz właściwości wzrostowe ESC i ekspresję markerów genowych [9, 10]. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste mają pewne cechy charakterystyczne dla komórek embrionalnych, dlatego obserwuje się powstawanie tkanek wywodzących się ze wszystkich trzech listków zarodkowych [10].

Indukowane komórki pluripotencjalne powstają dzięki procesowi przeprogramowywania jądra. Metoda ta jest jednym z czterech sposobów umożliwiających powstanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Aby komórka była pluripotencjalna, czynniki przeprogramowujące ją muszą przebyć barierę supresorów nowotworowych (antyonkogenów) i ścianę epigenetyczną (p. rys. 2) [11]. Proces przeprogramowania komórek somatycznych jest bardzo trudny



Rys. 1. Stochastyczny model (tj. model opisujący proces, w którym jest zawarty element losowości) przeprogramowywania komórki (na podstawie [11])

do kontrolowania, dlatego też jego efektywność (stosunek liczby udanych prób do wszystkich prób) mieści się w zakresie od 0,001% do 0,1%. Wpływa na to m.in. typ i ilość wyjściowych komórek. Wykorzystywanie wektora wirusowego w celu wywołania modyfikacji genetycznej może prowadzić do powstania mutacji nowotworowych. Metoda ta wymaga dopracowania, aby takie niebezpieczeństwo zostało zmniejszone do minimum. Mimo ogromnych korzyści terapeutycznych, koszty takiego eksperymentu są bardzo wysokie. Samo przeprogramowanie komórek trwa cztery miesiące. Dlatego też na wprowadzenie tej metody trzeba będzie jeszcze bardzo długo poczekać [12].

Poszczególne zestawy czynników powodują aktywację innych komórkowych szlaków sygnałowych. Mogą one doprowadzić do przyspieszenia wzrostu i tworzenia przerzutów albo do zahamowania wzrostu, w wyniku czego nastąpi śmierć komórki. Zatem MSC mogą odgrywać podwójną rolę w progresji raka, w zależności od stymulacji aktywnego szlaku i etapu procesu nowotworzenia. Całościowe zrozumienie sygnałów regulujących MSC-nowotwór jest bardzo ważne, ponieważ w przyszłości MSC będą prawdopodobnie stosowane w celach terapeutycznych (m.in. w leczeniu zmian zwyrodnieniowych stawów) [13]. Macierzyste komórki nowotworowe powstają w wyniku mutacji genetycznych zachodzących w komórkach macierzystych, dojrzałych, zróżnicowanych komórkach, a także komórkach już transformowanych. Pierwszy raz zidentyfikowano macierzyste komórki nowotworowe w przebiegu ostrej białaczki szpikowej w 1990 roku. Zaobserwowano, że mała liczba komórek w masie nowotworowej jest fenotypowo podobna do komórek macierzystych i może inicjować rozwój nowotworu u myszy z obniżoną odpornością immunologiczną. Od tej pory obecność nowotworowych komórek macierzystych stwierdzono np. w nowotworach jajnika, piersi, mózgu, prostaty, trzustki, wątroby [14].

Wiele badań sugeruje, że mezenchymalne komórki macierzyste wydzielają cytokiny, które hamują odpowiedź autorekatorywnych limfocytów T. Dodatkowo MSC prawdopodobnie nie mają właściwości komórek reprezentujących antygen. Powyższe informacje pozytywnie rokują na przyszłość, ponieważ takie właściwości biologiczne somatycznych komórek macierzystych prowadzą do osłabienia reakcji przeciw gospodarzowi w przeszczepach allogenicznych, jak również do zmniejszenia odsetka odrzutów w przeszczepach narządowych [15, 16].

Coraz więcej się mówi o wykorzystaniu komórek macierzystych jako leków. Sugeruje się nawet, że w przyszłości mogą one zastąpić większość stosowanych dzisiaj medykamentów. Prawdopodobnie będą to leki nowej generacji, które będą tworzone na podstawie ludzkiego genomu (m.in. będą miały takie właściwości, które umożliwią wyeliminowanie np. mutacji genetycznych doprowadzających do wielu śmiertelnych chorób). Konieczny jest rozwój nieinwazyjnych technik identyfikacyjnych *in vivo* komórek w celu zapewnienia jak największego bezpieczeństwa. Trzeba będzie jednak poświęcić wiele czasu na badania i ocenę kliniczną terapii opartych na komórkach macierzystych.

3. Podsumowanie

Aktualnie FDA uważa, że naukowcy muszą się jeszcze wiele nauczyć, aby móc określić bezpieczeństwo i skuteczność produktów leczniczych opartych na komórkach macierzystych. Brakuje im informacji o biologii samoodnowy i różnicowaniu się komórek, które pozwolą wyeliminować nieprawidłowe różnicowanie się komórek. Dotychczas powstało wiele regulacji, które odnoszą się do produktów biologicznych. Mają one na celu zapewnienie bezpieczeństwa użytkowania produktów opartych na komórkach macierzystych. Naukowcy prowadzący badania nad komórkami macierzystymi powinni być świadomi tych przepisów [17, 18].

Kontrowersyjne są również wyniki badań, które są prowadzone na różnych rodzajach komórek macierzystych. Ich nieprzewidywalne możliwości, które prowadzą do jej wyspecjalizowania nadal nie są do końca poznane i zrozumiane [19, 20, 21]. Oznacza to, że na razie ich wykorzystanie może nie być bezpieczne dla pacjenta. Nie zmienia to jednak faktu, że potencjał komórek macierzystych jest ogromny, szczególnie w przypadku schorzeń hematologicznych [22, 23].

LITERATURA

- [1] J. Rossant: *Reprogramming to Pluripotency: From Frogs to Stem Cells*, Cell, vol. 138, 2009, s. 1047–1050.
- [2] S. Yamanaka: *Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells*, Cell,

- vol. 1, 2007, s. 39–49.
- [3] J.M. Gimble, A.J. Katz, B.A. Bunnell: *Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine*, Circulation Research, vol. 100, 2007, s. 1249–1260.
- [4] Stem Cells: A Primer, 2002.
- [5] H.J. Ripon, A.E. Bishop: Embryonic stem cells, Cell Proliferation, vol. 37, 2004, s. 23–34.
- [6] A. Hoekstra: *Prospering on the Fat of the Land: Adipose – derived stem cells as an industrially-viable resource for regenerative treatment*, Basic Biotechnology, vol. 7, 2011, s. 24–30.
- [7] K. Jezierska-Woźniak, D. Nosarzewska, A. Tutas, A. Mikołajczyk, M. Okliński, M.K. Jurkowski: *Wykorzystanie tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej (online), vol. 64, 2010, s. 326–332.
- [8] A. Bajek, J. Olkowska, T. Drewa: *Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej (online), vol. 65, 2011, s. 124–132.
- [9] S.Y. Kazutoshi Takahashi: *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*, Cell, vol. 126(4), 2006, s. 663–676.
- [10] T. Kolanowski, M. Kurpisz: *Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste – geneza, problemy oraz perspektywy wykorzystania w terapii chorób serca*, Kardiologia Polska, vol. 68, 2010, s. 412–417.
- [11] J.B. Kim, B. Greber, M.J. Araúzo-Bravo, J. Meyer, K.I. Park, H. Zaehres, H.R. Schöler: *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*, Nature, vol. 461, 2009, s. 649–653.
- [12] K. Kozar-Kamińska: *Regeneracja serca*, Postępy w Kardiologii Interwencyjnej, vol. 8(30), 2012, s. 308–314.
- [13] A. Torsvik, R. Bjerkvig: *Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression*, Cancer Treatment Reviews, vol. 39(2), 2013, s. 180–188.
- [14] M. Statkiewicz, M. Małecki: *Macierzyste komórki nowotworowe, a oporność nowotworów na terapię*, Nowotwory Journal of Oncology, vol. 59(6), 2009, s. 456–463.
- [15] D. Urbaniak-Kujda, D. Wołowicz, B. Tomaszewska-Toporska, K. Kapelko-Słowik, K. Kuliczkowski: *Mezenchymalne komórki macierzyste: ich biologia i perspektywy zastosowań klinicznych*, Acta Haematologica Polonica, vol. 36(2), 2005, s. 161–166.
- [16] E. Klyushnenkova, J.D. Mosca, V. Zernetkina, M.K. Majumdar, K.J. Beggs, D.W. Simonetti, R.J. Deans, K.R. McIntosh: *T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression*, Journal of Biomedical Science, vol. 12, 2005, s. 47–57.
- [17] J. McNeish: *Embryonic stem cells in drug discovery*, Nature Reviews Drug Discovery, vol. 3, 2004, s. 70–80.
- [18] D.G. Halme, D.A. Kessler: *FDA Regulation of Stem-Cell-Based Therapies*, The New England Journal of Medicine, vol. 355, 2006, s. 1730–1735.
- [19] P. Li, H. Tian, Z. Li, L. Wang, C. Lian, Q. Ou, L. Lu, W. Li, G.T. Xu: *Subpopulations of bone marrow mesenchymal stem cells exhibit differential effects on delaying retinal degeneration*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 55 (13), 2014, s. 3990.
- [20] K. Marycz, K. Mierzejewska, A. Śmieszek, E. Suszynska, I. Malicka, M. Kucia, M. Z. Ratajczak: *Endurance Exercise Mobilizes Developmentally Early Stem Cells into Peripheral Blood and Increases Their Number in Bone Marrow: Implications for Tissue Regeneration*, Stem Cells International, 2015.
- [21] M. Marędziak, K. Marycz, A. Śmieszek, D. Lewandowski, N. Y. Toker: *The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue*, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, vol. 50(6), 2014, s. 562–571.
- [22] M. Witkowska, E. Smolewska, P. Smolewski: *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Autoimmune Connective Tissue Diseases*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, vol. 62(4), 2014, s. 319–327.
- [23] J. Styczyński, K. Czyżewski, K. Siewiera, J. Frączkiewicz, O. Zając-Spychała, J. Goździk, A. Zaucha-Prażmo, K. Kałwak, E. Gorczyńska, A. Chybicka, J. Wachowiak, J. Kowalczyk, M. Wysocki: *Viral infections in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation*, Acta Haematologica Polonica, 2015.

otrzymano / submitted: 14.06.2015

wersja poprawiona / revised version: 22.06.2015

zaakceptowano / accepted: 29.06.2015