

## KOMÓRKI MACIERZyste ORGANIZMU DOROSŁEGO W BIOLOGII I MEDYCYNIE

ADULT ORGANISM STEM CELLS IN BIOLOGY AND MEDICINE

Jerzy KAWIAK

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

*Streszczenie:* Okres życia komórek jest ograniczony, a komórki obumierające są zastępowane nowymi, zróżnicowanymi, pochodzącymi od komórek macierzystych. Komórki macierzyste w organizmie dorosłym można wykryć markerami obecnymi zarówno w komórkach macierzystych embrionalnych, jak i komórkach macierzystych w tkankach. Przykładem tych markerów są białka: Oct3/4, CXCR4, Nanos, CD133, CD34. Wspólne funkcje komórek macierzystych to: 1) zdolność do samoodnowy (po podziale powstają nowe komórki macierzyste), 2) zdolność do różnicowania w wyspecjalizowane komórki tkanek i narządów, 3) oporność na stesy toksyczne oraz radiacyjne. Komórki macierzyste są obecne w różnych miejscach dorosłego organizmu, np. w naskórku, w nabłonku przewodu pokarmowego, w mięśniach szkieletowych. Skupienia tych komórek nazywamy nisiami komórek macierzystych. Są one tam zatrzymywane układami chemokinowymi. Znanym układem chemokinowym w szpiku kostnym jest ligand SDF-1 (*Stroma Derived Factor-1*) oraz receptor na komórkach macierzystych CXCR4. Czynniki wywołujące stres mogą indukować spadek poziomu SDF-1 w szpiku kostnym, co powoduje przemieszczanie się komórek macierzystych do układu krążenia oraz do nowych nisz. Innym znanym układem chemokinowym jest układ Wnt(ligand)/Frizzle LPR (kompleks receptora) na powierzchni komórek. Pierwszym bezpośrednim dowodem istnienia komórek macierzystych nowotworowych były obserwacje komórek ostrej białaczki mieloidalnej. Rozpoczęto izolowanie oraz opisy takich komórek w różnych guzach. Komórki macierzyste nowotworowe stanowią zwykle mniej niż 1% komórek guza w modelach mysich. Przyjmuje się, że mutacje w komórkach macierzystych prawidłowych mogą doprowadzić do transformacji w komórki nowotworowe. Długi okres interfazy komórek macierzystych nowotworowych sprzyja gromadzeniu w nich mutacji, a oporność na czynniki toksyczne chroni te komórki przed działaniem leków.

*Słowa kluczowe:* komórki macierzyste, komórki macierzyste nowotworowe, nisze, markery, modele mysie.

*Summary:* Life span of the adult cells is restricted and senescent/undergoing apoptosis cells are replaced by new ones that originate from population of stem cells. An example is the hemopoietic system in the bone marrow. Stem cells in the adult organism may be identified by markers that are expressed by both embryonic stem cells and tissue-specific stem cells. Oct3/4, CXCR4, Nanog, CD133 and CD34 are examples of such markers. The stem cells share several common properties such as they may: 1) replicate and give rise to new stem cells, 2) differentiate into heterogenous tissue and organ specific cells, and finally 3) stem cells are self-protected against various toxic agents and radiation. Stem cells reside in the adult tissues in specialized sites (niches) that are identified e.g., in the bone marrow, skin, digestive tract epithelium, and skeletal muscles. Stem cells that reside in stem cell niches are anchored by chemokines and

adhesion molecules. An important role in retention of stem cells in niche plays  $\alpha$ -chemokine SDF-1 (Stroma Derived Factor-1) and stem-cell expressed receptor CXCR4. Several stress factors may attenuate SDF-1-CXCR4 axis in the bone marrow, what leads to release of stem cells from their niches into circulation. Another important stem cell niche-anchoring mechanism is interaction of Wnt (ligand with Frizzled LRP (receptor). Recent evidence accumulated, that malignancy arises from maturation arrest of stem cells and their mutation rather than the dedifferentiation of somatic cells. Cancer stem cells are responsible for tumor growth, its re-growth and metastasis. The first direct evidence for the existence of cancer stem cells came from observations of the acute myeloblastic leukemia. Currently cell population enriched for cancer stem cells were isolated from several tumors. The cancer stem cells represent less than 1% of tumor cells in the mouse models.

*Key words:* stem cells, cancer stem cells, markers, mouse models, niches.

## WSTĘP

Ciało dorosłej osoby jest zbudowane według różnych ocen, z  $10^{13}$ – $10^{15}$  komórek. Czas życia pojedynczych komórek jest różny, ale ograniczony i dla niektórych rodzajów komórek został określony [17]. Komórki obumierające są zastępowane nowymi, które wywodzą się i różnicują z tkankowych komórek macierzystych krążących we krwi. Jednym z lepiej poznanych układów odtwarzania komórek z komórek macierzystych jest układ macierzystych komórek hemopoetycznych (HSC) w szpiku kostnym [25]. Termin „komórki macierzyste” dla komórek macierzystych układu hemopoetycznego w piśmiennictwie polskim zaproponował W. Jędrzejczak w 1989 r. [25]. Terminy stosowane w związku z komórkami macierzystymi oraz ich definicje przedstawiono w tabeli 1.

## WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK MACIERZYSTYCH I SUGESTIE WYKORZYSTANIA ICH W LECZENIU

W wielu tkankach organizmu dorosłego znajdowano nieliczne komórki mające ekspresję białek-markerów obecnych w komórkach embrionalnych wężła zarodkowego [44, 54, 61] (tab. 2). Komórki te można było izolować i bliżej zbadać *in vitro*. Nazwano je komórkami macierzystymi (ang. *stem cells*). Na komórkach macierzystych hemopoetycznych (HSC) w szpiku kostnym u dorosłych oraz u rozwijających się zarodków jest powierzchniowe białko-marker CD34 [15]. Krew obwodowa zawiera nieliczne komórki HSC, ale w krwi pępowinowej jest wiele komórek macierzystych uwalnianych tam ze szpiku kostnego podczas stresu porodowego. Komórki te mogą być izolowane z łożyska oraz ze sznura pępowinowego, czyli z tkanek odrzucanych po porodzie. Tak otrzymane komórki macierzyste krwi pępowinowej mogą być wykorzystane u dzieci do odtworzenia układu hemopoetycznego, podawane choremu po wykrwawieniu w wyniku wypadku czy podczas operacji chirurgicznych [4]. Komórki te są również podawane wraz z masą leukocytarną chorym po intensywnej terapii lekami przeciwnowotworowymi, gdy są również uszkodzane leukocyty, erytrocyty i płytki krwi. Komórki macierzyste

TABELA 1. Definicje terminów z zakresu komórek macierzystych (wg [19] zmienione)  
 TABLE 1. Definitions of terms used in stem cell description (according to [19], modified)

Nazwa (termin)	Definicja	Przykłady
Komórka macierzysta	komórka długo żyjąca, zdolna do samoodnowy, proliferacji i wielokierunkowego różnicowania	VSELs
Komórka macierzysta tkankowa	komórka długo żyjąca, zdolna do samoodnowy, proliferacji i wielokierunkowego różnicowania w obrębie określonej tkanki	komórka macierzysta hemopoetyczna
Komórka progenitorowa	komórka zdolna do podziałów, która może dać co najmniej jedno pokolenie	komórka płucna neuroendokrynną
Komórka macierzysta nowotworowa	komórka nowotworowa o zwiększonym potencjale regeneracyjnym oraz oporna na toksyny, odnawiająca wzrost nowotworu	ostra białaczka mieloidalna (AML)

pochodzące ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej i różnych narządów myszy oraz człowieka opisano szczegółowo podając ich cechy morfologiczne, jak i obecność w nich białek markerowych [32,33,49,67]. Komórki te są bardzo małe, u myszy o średnicy 3–5  $\mu\text{m}$  i mają markery komórek embrionalnych, stąd nadano im nazwę małych komórek macierzystych o cechach embrionalnych – VSELs (*Very Small Embryonic-Like*). Komórki VSELs znajdowano w różnych tkankach organizmu dorosłego i określono ich liczbę zmniejszającą się z wiekiem organizmu [68]. Wysunięto hipotezę, że komórki te są zachowywane po okresie życia zarodkowego w szpiku kostnym jako mobilna populacja prekursorowych komórek krążących. Odgrywałyby one ważną rolę w postnatalnej wymianie komórek hemopoetycznych, jak i niehemopoetycznych.

Komórki macierzyste śródbłonna w szpiku kostnym oraz w tkankach również mają ekspresję CD34. Subpopulacja ta może *in vitro*, w obecności kilku czynników: zasadowego FGF – bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) oraz VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), różnicować się w komórki śródbłonna. Te komórki można odróżnić, bo obok antygenu CD34, zawierają czynnik von Willebranda (vWF) i włączają lipoproteidy o małej gęstości – LDL (*Low Density Lipoprotein*). Aby rozstrzygnąć, czy komórki prekursorowe śródbłonkowe są stale obecne w krążeniu i pochodzą ze szpiku kostnego *in vivo*, wykorzystano przeszczepy szpiku u różniących się genetycznie psów [55]. Analizowano

TABELA 2. Markery znajdujące w komórkach macierzystych szpiku kostnego człowieka, a obecne również w komórkach macierzystych embrionalnych ([49], zmienione)

TABLE 2. Stem cell markers of human bone marrow cells, present on embryonal stem cells ([49], modified)

Komórki	Markery
Komórki progenitorowe śródbłonna naczyń	CD133, CD34, CD31, CD117=c-kit
Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC)	CD105, CD133, CD90
Very small embryonic-like stem cells (VSELs)	CD133, CD34, Oct3/4, SSEA-4

DNA komórek tworzących nowe naczynia krwionośne z prekursorowych komórek CD34+ szpiku kostnego implantowane od innego psa. Okazało się, że komórki śródbłonka naczyń pochodziły z komórek krążących we krwi biorcy. Już w roku 1971 [29] wykazano, że komórki śródbłonka tętnic wieńcowych człowieka po przeszczepieniu serca pochodzą od biorcy, a nie od dawcy. Można więc wnosić, że po obumarciu komórek śródbłonka serca dawcy są one zastępowane krążącymi komórkami prekursorowymi biorcy.

Komórki macierzyste neuralne są potencjalnym źródłem komórek w leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych. Hodując komórki pobrane biopsyjnie ze skóry albo z tkanki tłuszczowej otrzymano *in vitro* w obecności czynników FGF2 (*Fibroblast Growth Factor*2) oraz EGF (*Epithelial Growth Factor*) prekursorów neuronów nestyno (+) [62]. Nestyna jest markerem komórek neuronalnych. Inni autorzy [26] opisali otrzymanie komórek nestyno (+) z biopsyjnie pobranej skóry osoby dorosłej po hodowli *in vitro* w odpowiednio dobranych warunkach.

Porównano też różne źródła komórek macierzystych mezenchymatycznych – MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) [13] dla otrzymania materiału osteogennego celem odtwarzania kości. MSC z tkanki tłuszczowej okazały się mało przydatne do otrzymania *in vivo* tkanki osteogennej, natomiast dobre były do tego celu MSC pochodzące ze szpiku kostnego albo z okostnej [21]. Markerami różnicowania osteogennego były w tych doświadczeniach alkaliczna fosfataza oraz osteokalcyna.

W innych doświadczeniach *in vitro* porównywano zdolność różnicowania do komórek wątroby MSC ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej [59]. Obserwowano podobny potencjał do różnicowania komórek z obu tkanek, co może zachęcać do dalszych prób wykorzystania autologicznych komórek tkanki tłuszczowej do wspomagania funkcji wątroby. Jednak według ostatnio opublikowanej pracy [13] komórki MSC szpiku kostnego człowieka nie mogą różnicować się do hepatocytów, ale mogą do osteoblastów, chondrocytów, adipocytów oraz mięśni gładkich naczyniowych.

Fizjologiczne właściwości komórek macierzystych opisywane przez wielu autorów są podobne. Opis taki pozwala tłumaczyć zachowania tych komórek w prawidłowych tkankach organizmu dorosłego, jak również w tkankach zmienionych chorobowo. Podstawowymi właściwościami komórek macierzystych są: a) zdolność do odtwarzania się, czyli z komórki macierzystej może powstawać nowa komórka macierzysta, jednak częstość podziałów tych komórek jest nieduża, b) zdolność do różnicowania w komórki tkanek/narządów, a w trakcie tego procesu komórki przechodzą wiele podziałów dając wiele komórek zróżnicowanych, c) oporność na czynniki szkodliwe, takie jak toksyny i promieniowanie. Ta ostatnia właściwość chroni komórki macierzyste i pozwala im przeżyć nawet w warunkach, gdy inne komórki obumierają. Oporność komórek na toksyny tłumaczy się ich zdolnością do wyrzucania toksyn z cytoplazmy, co można oceniać metodami cytometrycznymi. Komórki macierzyste wyrzucają np. z cytoplazmy jeden z barwników fluorescencyjnych – barwnik Hoechst 33342 i łatwo można je wtedy odróżnić od pozostałych komórek, ponieważ na wykresach cytometrycznych oddzielają się do boku od głównej masy komórek, stąd nazywa się je „populacją boczną” – SP (ang. *side population*) komórek [15,23]. Molekularną determinantą zachowania się tej populacji komórek jest układ transporterów ABC [58].

## UKŁADY CHEMOKINOWE I NISZE KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Komórki macierzyste organizmu przebywają w określonych miejscach nazywanych niszami tkankowymi albo narządowymi. Komórki te są utrzymywane w niszach układami chemokinowymi. Jednym z nich jest układ liganda SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*) i receptora na komórkach macierzystych – CXCR4. Receptor nie jest równomiernie rozmieszczony na powierzchni komórek, ale jest włączany do lipidowych tratw (ang. *rafts*) w błonach komórkowych [65]. SDF-1 jest produkowany przez komórki zrębu np. szpiku kostnego i moduluje adhezję do fibronektyny. Komórki, nieprzyczepione na stałe do podłoża i mające odpowiedni receptor, są zatrzymywane w miejscach, gdzie gromadzi się SDF-1. Przyjmuje się, że dzięki temu układowi komórki macierzyste hemopoetyczne oraz inne komórki mające receptor CXCR4 są utrzymywane w niszy szpiku kostnego [64]. W tej niszy układ zapewnia sygnalizację międzykomórkową przez zmiany stężenia liganda oraz ekspresji receptora CXCR4. Układ warunkuje też uwalnianie komórek pod wpływem czynników regulatorowych, takich jak G-CSF, oraz toksyn, np. cyklofosfamidu, czy czynników stresu organizmu, jak podczas porodu czy zawału mięśnia sercowego [63]. Wtedy komórki macierzyste są uwalniane z niszy i przenikają do krwi obwodowej, by tą drogą dotrzeć do miejsc zagrożonych wymagających naprawy. W warunkach doświadczalnych zablokowanie układu SDF-1/CXCR4 przez podanie inhibitora AMD3100 hamuje oddziaływanie między ligandem a receptorem, co prowadzi do wyrzucania ze szpiku HSC [13,22].

Innym układem chemokinowym działającym w niszach komórek macierzystych i ważnym dla utrzymania komórek jest układ Wnt [37,50]. Rodziny glikoproteidów Wnt są wydzielane i przekazują sygnały w wielu procesach biologicznych podczas embriogenezy i organogenezy [48]. Białka te są ligandami, a ich receptorami w błonie komórek docelowych są kompleksy białka G Frizzled związanego z LRP (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein*). Białka receptorowe Frizzled są zakotwiczone siedmioma odcinkami w błonie komórkowej. LRP kompleksów receptorowych jest rodziną białek liczącą u człowieka około 20 różnych cząsteczek. Sygnalizacja układem Wnt jest konserwowana i kluczowa w kontroli oddziaływań międzykomórkowych podczas embriogenezy [8], jak i w organizmie dorosłym [9]. Ten układ w tkankach dorosłych zapewnia sygnalizację regulującą przemieszczanie się komórek wzdłuż nabłonka, co może nas tutaj interesować ze względu na regulację nisz komórkowych.

Warto przypomnieć istnienie różnych nisz komórek macierzystych. Hemopoetyczne komórki macierzyste (HSC) w niszy szpikowej można cytochemicznie wyróżnić tym, że na powierzchni komórki te mają białko CD34 oraz receptory CXCR4, ale nie mają ekspresji CD38 [15]. Pewna liczba HSC stale krąży i we krwi obwodowej stanowi ok. 0,1% leukocytów. Liczba krążących HSC zwiększa się wielokrotnie pod wpływem czynników toksycznych, jakimi są niektóre leki przeciwnowotworowe. Takie uwalnianie z niszy szpikowej HSC jest obecnie standardową techniką stosowaną w transplantologii, gdy zamiast nakłuwania kości celem otrzymania szpiku

kostnego z zawartymi w nim HSC dla dokonania przeszczepu [35] podaje się dawcy cyklofosfamid albo G-CSF bądź oba te czynniki łącznie. Wtedy komórki macierzyste wyrzucane są ze szpiku kostnego i można pobierać je z krwi obwodowej oraz podawać choremu w odpowiedniej dawce zależnej od masy ciała [4].

Komórki macierzyste jelita cienkiego są zlokalizowane na dnie krypt. Jest ich 4–6 w każdej krypte i można je odróżnić po ekspresji genu *Lgr5* metodą hybrydyzacji *in situ* [5]. Niektóre komórki macierzyste dna krypty rozpoczynają różnicowanie częstymi podziałami i wtedy przesuują się wyżej w krypte, a to wiąże się z ich dalszym różnicowaniem. Populację często dzielących się komórek można odróżnić markerami proliferacji (Ki67, BdrU), ale też ekspresją genu *Wdr43*. Przesuwając się do ujścia krypty, a potem na kosmki jelitowe, komórki te różnicują się w 3 typy: enterocyty, komórki kubkowe oraz komórki enteroendokrynowe. W dnie krypt pozostaje czwarty typ zróżnicowanych komórek, komórki Panetha, które odróżnia się morfologicznie oraz ekspresją genu *Defa 1*. Podobnie zachowują się komórki macierzyste jelita grubego mające niszę w dnie krypt [12,43,51]. Te komórki również odróżnia się ekspresją genu *Lgr5* [5]. Komórki dna krypt rzadko dzielą się, ale podobnie różnicowanie rozpoczynają od częstych podziałów. Różnicują się w enterocyty oraz komórki kubkowe, a u ujścia krypty przestają się dzielić i przesuują na powierzchnię nabłonka, gdzie podlegają apoptozie i złuszczeniu.

Komórki macierzyste naskórka mają nisze w torebce włosowej mniej więcej w połowie wysokości torebki i można je odróżnić markerem CD200. Stanowią tam większe nagromadzenie komórek nazywane wypukleniem (ang. *bulge*) [6,45]. Stąd komórki różnicujące się, po podziałach przesuują się do gruczołu łojowego oraz na powierzchnię skóry tworząc naskórek. Inne komórki macierzyste przemieszczają się w kierunku przeciwnym, do cebulki włosa skąd wyrasta gałąź włosa. Wypuklenie jest miejscem uprzywilejowanym immunologicznie [41]. Komórki tam leżące mają niską ekspresję MHC kl I i II oraz  $\beta 2$ -mikroglobuliny, a wysoką czynników immunosupresorowych, takich jak TGF $\beta 2$ , czynnika hamującego migrację makrofagów.

## **POCHODZENIE TKANKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH I MOŻLIWOŚCI REPROGRAMOWANIA KOMÓREK ZRÓŻNICOWANYCH**

Pochodzenie komórek macierzystych znajdujących się w organizmie dorosłym nie jest oczywiste. Za jeden z podstawowych dowodów na ich obecność w tkankach/narządach organizmu uważa się znajdowanie w tych komórkach białek markerowych, które są również obecne w komórkach wężła zarodkowego we wczesnym okresie życia [44,54,61]. Komórki takie mogą więc być „pozostałością” komórek zarodkowych, które są i dzielą się u dorosłego. Komórki macierzyste w tkankach mogą mieć różny potencjał rozwojowy, przeważnie są multipotencjalne.

Potencjał rozwojowy komórek embrionalnych podczas prawidłowego rozwoju zarodka zmniejsza się. Jak o tym wspomniano, w organizmie dorosłym i w błonach płodowych są obecne komórki o charakterze multipotencjalnym, tkankowe komórki macierzyste (tab. 1). Komórki te o mniejszym potencjale rozwojowym, ale o cechach komórek embrionalnych, również w życiu dorosłym mają ekspresję białek markerowych obecnych w komórkach wężła zarodkowego [44,61]. Takimi markerami komórkowymi są: alkaliczna fosfataza, SSEA-1, Oct4, Nanog. Zaobserwowano również ubywanie liczby komórek macierzystych tkankowych z wiekiem organizmu u ssaków [67], co może świadczyć o wyczerpywaniu się zapasu komórek macierzystych z wiekiem osobniczym.

Ostatnio są czynione próby otrzymania komórek pluripotencjalnych z komórek somatycznych jako wynik reprogramowania [10,40,56]. Molekularne mechanizmy tego procesu nie są dokładnie poznane. Próbowano transdukcji mysich i ludzkich komórek somatycznych czterema czynnikami transkrypcyjnymi dla stopniowego przekształcenia małej subpopulacji w komórki pluripotencjalne, podobne do komórek macierzystych embrionalnych [38]. Badania były prowadzone na różnych komórkach somatycznych, między innymi na mysich fibroblastach transfekowanych *in vitro* wektorem przenoszącym cDNA genów *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* oraz *Klf4* [40]. Komórki reprogramowane określono nazwą komórek iPS (ang. *induced Pluripotent Stem cells*). Są one zdolne do różnicowania się w komórki trzech listków zarodkowych, również w komórki rozrodcze myszy chimerycznej [46]. Analizy metylacji DNA oraz modyfikacji histonów dowodzą, że chromatyna mysich komórek iPS została reprogramowana do stanu zarodkowego. Dotyczyło to demetylacji endogennych promotorów kontrolujących specyficzne geny *Nanog* oraz *Oct4*. Zbadano też kolejność aktywacji podstawowych czterech czynników wcześniej uznanych jako niezbędne do reprogramowania mysich fibroblastów (tab. 3) [7]. Zaobserwowano, że ekspresja SSEA1 po ekspresji alkalicznej fosfatazy jest stanem pośrednim, który musi być podtrzymany, aby była możliwa późniejsza ekspresja genów *Oct4* oraz *Nanog*. Aktywacja endogennych *Oct4* oraz *Nanog* może być markerem pełnego reprogramowania komórki iPS, już niezależnego od dodatkowych aktywnych genów. Stwierdzono również, że niektóre komórki macierzyste w tkankach mają ekspresję kilku kluczowych dla reprogramowania czynników transkrypcyjnych. Komórki progenitorowe neuralne mogą wtedy być reprogramowane dwoma czynnikami (*Oct4* i *Klf4*) [30], a nawet jednym (*Oct4*).

Układy reprogramowania opracowano dla bardzo różnych komórek somatycznych: limfocytów B [20], komórek skóry [26], dla ludzkich keratynocytów [1]. Ustalono też, że równoczesne zahamowanie kinazy białkowej aktywowanej mitogenami – MAKP

TABELA 3. Reaktywacja markerów pluripotencjalności podczas reprogramowania fibroblastów mysich *in vitro* (wg opisu Brambrink et al. [7])

TABLE 3. Reactivation of pluripotential markers in reprogrammed mice fibroblasts *in vitro* (according description Brambrink et al. [7])

Dzień od indukcji	Alkal. fosfataza % komórek (+)	SSEA1	Nanog	Oct4
3	3–4	0	0	0
9	28	4	0	0
12	38	9	0	0
16	38	9	0,2	0,2
26	82	11	2	2
35	76	16	3	3

(*Mitogen-Activated Protein Kinase*) i kinazy-3 syntazy glikogenu – GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) oraz odnowienie ekspresji LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) kieruje pre-pluripotencjalne komórki do stanu pełnej pluripotencji [56].

## KOMÓRKI MACIERZyste NOWOTWOROWE

Postępy terapii nowotworów znacznie przedłużyły życie wielu chorym. Jednak z praktyki lekarskiej wiadomo, że po korzystnym wyniku terapii początkowej często dochodzi do wznowy nowotworu, a w przypadku guzów litych do przerzutów nowotworowych. Jest coraz więcej dowodów na to, że wzrost i rozprzestrzenianie się wielu nowotworów zależy od małej subpopulacji komórek w nowotworze, nazywanej komórkami macierzystymi nowotworowymi [24,27]. Zgodnie z tym poglądem, nowotwór nie jest tylko wzrostem monoklonalnych komórek transformowanych, ale złożoną tkanką, gdzie nieprawidłowy wzrost jest „napędzany” przez nieliczne, patologicznie zmienione komórki macierzyste o takich cechach, jak niekontrolowany wzrost i zdolność do tworzenia przerzutów, ale też zachowujących zdolność do własnej odnowy i różnicowania w fenotypowo różne potomstwo. Wspierają ten pogląd obserwacje eksperymentalne, początkowo przeprowadzone na komórkach ludzkiej ostrej białaczki szpikowej – AML (*Acute Myeloid Leukemia*). W 1994 r. Lapidot wsp. [34] udokumentowali obecność białaczkowych komórek macierzystych w ostrej białaczce szpikowej klonowaniem tych komórek oraz obserwacją ich zdolności do samoodnowy. Wysortowane i oddzielone komórki subpopulacji CD34+CD38– ostrej białaczki pobrane od chorego i wszczepione myszy SCID inicjowały białaczkę, podczas gdy nie miały tej właściwości komórki CD34+CD38+ ani komórki CD34–. Myszy SCID mają niedobory immunologiczne, niesprawny układ odpornościowy i dlatego nie odrzucają ksenoprzeszczepów komórek człowieka. Komórki białaczki rozwijającej się u myszy można było przeszczepiać do następnych myszy, co sugeruje, że komórki implantowane pierwotnie mają zdolność do samoodnowy. Takie obserwacje komórek nowotworowych, jak zdolność do samoodnowy oraz do ponownego wzrostu po przeniesieniu pojedynczych komórek nowotworowych do nowej myszy, przyjmuje się za podstawowe kryterium nowotworowej komórki macierzystej. Podobne komórki macierzyste nowotworowe identyfikowano nie tylko w AML, ale również w guzach litych [3,14,18,19,47,51,57]. Również w liniach komórek nowotworowych obserwowano obecność komórek macierzystych nowotworowych [28,31]. Koncepcja istnienia komórek macierzystych nowotworowych może mieć duże znaczenie dla terapii mającej na celu całkowite usunięcie nowotworu u chorego.

Trudno jest ustalić, jak może dochodzić do powstania komórek macierzystych nowotworowych. Ocenia się, że częstość mutacji spontanicznych jest  $10^{-6}$  do  $10^{-7}$  mutacji na gen na podział komórki [2]. U człowieka podczas całego jego życia zachodzi około  $10^{16}$  podziałów komórek, stąd można wyliczyć, że każdy gen człowieka ma szansę ulec mutacji więcej niż  $10^9$  razy. Mutacje te są najczęściej



sprawnie reperowane w komórce bądź komórki ze zmutowanymi genami są usuwane przez układ odpornościowy.

Może się zdarzyć, że w komórce macierzystej pojawią się mutacje onkogenne podobnie jak w genomie komórek zróżnicowanych. Często trzy takie kolejne mutacje onkogenne w komórce decydują o jej charakterze nowotworowym. Zwykle dla określenia takich komórek bierze się pod uwagę kilka ich cech:

a) zdolność do odtwarzania się – co jednak nie oznacza, że komórki dzielą się często; skutkiem jest możliwość kumulowania w tej samej komórce mutacji prowadzących do pozyskania cech komórki nowotworowej.

b) zdolność do różnicowania się w komórki tkanek czy narządów; nowotwór pierwotny może być zbudowany z komórek zróżnicowanych, a komórki macierzyste zwykle stanowią tylko mały procent wszystkich komórek nowotworowych. Inaczej jednak może być w przypadku eksperymentalnych nowotworowych linii komórkowych, gdzie większość komórek może mieć cechy macierzystych dzięki selekcji, jak ma to np. miejsce w przypadku mysich komórek białaczki L1210 [28].

c) oporność na czynniki szkodliwe – gdyż komórki macierzyste nowotworowe mają wysoką ekspresję transporterów rodziny ABC (*ATP Binding Casette*) [39,58]. Te cechy komórek macierzystych nowotworowych są podobne do tych w komórkach macierzystych nienowotworowych.

Tutaj jednak warto podkreślić jeszcze inne cechy komórek macierzystych nowotworowych: ekspresję antygenów charakteryzujących komórki macierzyste embrionalne, takich jak: Oct3/4, SSEA1, CD133, CD90, zdolność do reperacji DNA [42], obniżoną zdolność do inicjowania apoptozy.

Wśród komórek izolowanych z nowotworów pierwotnych, jak i wśród komórek linii nowotworowych odkryto wspomniane już komórki SP (*side population*), populacje komórek wyrzucające z cytoplazmy barwnik Hoechst. Zakłada się, że podobnie jak barwnik, komórki tej SP mogą pozbywać się leków stosowanych w terapii [15, 23]. Komórki SP wysortowane okazały się rzeczywiście komórkami podtrzymującymi wzrost nowotworu po implantacji do myszy. Wykryto też, że komórki SP mają wysoką ekspresję błonowych białek transportujących rodziny ABC, a wśród nich również transporter oporności wielolekowej MDR-1 (*MultiDrug Resistance transporter-1*) [11] oraz BCRP-1 (*Breast Cancer Resistance Protein-1*), chociaż nie znajdowano korelacji między liczbą komórek SP+ i MDR-1+ u pacjentów z AML. Artykuły przeglądowe oraz prace eksperymentalne na temat prób terapii kierowanej na komórki macierzyste nowotworowe publikowali różni autorzy [11,43,52,60,66]. Ten kierunek terapii wydaje się obecnie najbardziej racjonalny.

## LITERATURA

- [1] AASEN T, RAYAA, BARRARO MJ et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnol* 2008; **26**: 1276–1284.  
[2] ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K et al. Podstawy biologii komórki (tłum. polskie) 2005 PWN Warszawa: 728–729.

- [3] AL-HAJJ M, CLARKE MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; **23**: 7274–7282.
- [4] ALLAN DS, KEENEY M, HOWSON-JAN K et al. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hemopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; **29**: 967–972.
- [5] BARKER N, van ES JH, KUIPERS J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; **449**: 1003–1007.
- [6] BLAUPAIN C, LOWRY WE, GEOGHEGAN A et al. Self-renewal, multipotency and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004; **118**: 635–648.
- [7] BRAMBRINK T, FOREMAN R, WELSTEAD GG et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 151–159.
- [8] CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; **11**: 3286–3305.
- [9] CHENG JH, SHE H, HAN Y-P et al. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest* 2008; **294**: G39–G49.
- [10] CIEMERYCH MA. Zarodkowe komórki macierzyste – w poszukiwaniu pluripotencji. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 183–205.
- [11] COLLINS AT, BERRY PA, HYDE C et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 10946–10951.
- [12] DALERBA P, DYLLA SJ, PARK IK et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10158–10163.
- [13] DELORME B, RINGE J, PONTIKOGLOU C et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* 2009; **27**: 1142–1151.
- [14] FANG D, NGUYEN TK, LEISHEAR K et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005; **65**: 9328–9337.
- [15] FEURING-BUSKE M [10], HOGGE DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34+CD38– progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; **97**: 3882–3889.
- [16] FLOMENBERG N, DEVINE SM, DIPERSIO JF et al. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hemopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 2005; **106**: 1867–1874.
- [17] FURNE JK, SPRINGFIELD JR, HO SB, LEVITT MD. Simplification of the end-alveolar carbon monoxide technique to assess erythrocyte survival. *J Lab Clin Med* 2003; **142**: 52–57.
- [18] GIBBS CP, KUKKOV VG, REITH JD et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 2005; **7**: 967–976.
- [19] GLANGRECO A, GROOT KR, JANES SM. Lung cancer and lung stem cells. Strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 547–553.
- [20] HANNA J, MARKONLAKI S, SCHOERDRET P et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; **133**: 250–261.
- [21] HAYASHI O, KATSUBE Y, HIROSE M et al. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008; **82**: 238–247.
- [22] HESS DA, BONDE J, CRAFT TC et al. Human progenitor cells rapidly mobilized by AMD3100 repopulate NOD/SCID mice with increased frequency in comparison to cells from the same donor mobilized by G-CSF. *Biol Blood Marrow Transpl* 2007; **13**: 398–411.
- [23] HIRSCHMANN-JAX C, FOSTERAE, WULF GG et al. A distinct „side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 14228–14233.
- [24] HOPE KJ, JIN L, DICK JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell clones that differ in self-renewal capacity. *Nature Immunol* 2004; **5**: 738–743.
- [25] JEDRZEJCZAK WW. Komórki macierzyste krwiotworzenia. W: *Ultrastruktura i funkcja komórki*. Kawiak J, Osuchowska Z, Przełęcka A (red.), t.3, PWN, Warszawa: 1989: 31–75.
- [26] JOANNIDES A, GAUGHWIN P, SCHWIENING C et al. Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet* 2004; **364**: 172–178.
- [27] JORDAN CT, GUZMAN ML, NOBLE M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1253–1261.
- [28] KAWALEC M, SKORSKI T, KAWIAK J. Successful chemoimmunotherapy of Marine L1210 lymphatic leukemia with cyclophosphamide and mafosfamide-treated leukemia cells. *Invest New Drugs* 1988; **6**: 169–172.

- [29] KENNEDY LJ, Jr, WEISSMAN IL. Dual origin of intimal cells in cardiac-allograft arteriosclerosis. *New Engl J Med* 1971; **285**: 884–887.
- [30] KIM JB, ZAEHRES H, WU G et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; **454**: 646–650.
- [31] KONDO T, SETOGUCHI T, TAGA T. Persistence of small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 781–786.
- [32] 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.
- [33] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL FR et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SEA-1(+)/Oct-4(+) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857–869.
- [34] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645–648.
- [35] LEVESQUE JP, HENDY J, TAKARNATSU Y et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003; **111**: 187–196.
- [36] LILES WC, RODGER E, BROXMEYER HE et al. Augmented mobilization and collection of CD34+ hemopoietic cells from normal human volunteers stimulated with G-CSF by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 2005; **45**: 295–300.
- [37] LOGAN CY, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 781–810.
- [38] LOH YH, AGRAVAL S, PARK IH et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009; **113**: 5476–5479.
- [39] LOU H, DEAN M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 2007; **26**: 1357–1360.
- [40] MEISSNER A, WERING M, JAENISCH R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature Biotechnol* 2007; **25**: 1177–1181.
- [41] MEYER KC, KLATTE JE, DINH HV et al. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol* 2008; **159**: 1077–1085.
- [42] NOWACKA-ZAWISZA M, KRAJEWSKA WM. Rola białek BCRA1, BCRA2 i RAD51 w zachowaniu stabilności genomu. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 679–694.
- [43] O'BRIEN CA, POLLET A, GALLINGER S, DICK JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; **445**: 106–110.
- [44] O'CONNOR MD, KARDEL MD, IOSFINA I et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 1109–1116.
- [45] OHYAMA M. Advances in the study of stem cell-enriched hair follicle bulge cells: a review featuring characterization and isolation of human bulge cells. *Dermatology* 2007; **214**: 342–351.
- [46] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**: 313–317.
- [47] PATRAWALA L, CALHOUN T, SCHNEIDER-BROUSSARD R et al. Highly purified CD44 prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 2006; **25**: 1696–1708.
- [48] PATTHEY C, EDLUND T, GUNHAGA L. Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate. *Development* 2009; **136**: 73–83.
- [49] RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA EK, MACHALINSKI B et al. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization and biological significance. *Stem Cell Rev* 2008; **4**: 89–99.
- [50] REYA T, CLEVERS H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; **434**: 843–850.
- [51] RICCI-VITIANI L, LOMBARDI DG, PILOZZI E et al. Identification and expression of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445**: 111–115.
- [52] ROBEY RW, STEADMAN K, POLGAR O et al. Pheophorbide  $\alpha$  is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* 2004; **64**: 1242–1246.
- [53] ROBEY RW, TO KK, POLGAR O et al. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; **61**: 3–13.
- [54] ROSSANT J. Stem cells and early lineage development. *Cell* 2008; **132**: 527–531.

- [55] SHI Q, RAFII S, HONG-DEWU M et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**: 362–367.
- [56] SILVA J, BARRANDON O, NICHOLS J et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008; **6**: e253.
- [57] SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID et al. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 2004; **432**: 396–401
- [58] SWERTS K, DEMOLERLOOSE B, DHOOGHE C et al. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 295–309.
- [59] TALENS-VISCONTI R, BONORA A, JOVER R et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal cells. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 5834–5845.
- [60] TANG C, ANG BT, PERVAIZ S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 2007; **21**: 3777–3785.
- [61] THOMSON JA, ITZKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147.
- [62] VINDIGNI V, MICHELOTTO L, LANCEROTTO L et al. Isolation method for a stem cell population with neural potential from skin and adipose tissue. *Neurol Res* 2009; publ ahead PMID15246730
- [63] WOJAKOWSKI W, TENDERA M, MICHALOWSKA A et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells and mononuclear cells expressing early cardiac muscle and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; **110**: 3213–3220.
- [64] WRIGHT DE, WAGERS AJ, GULATI AP et al. Physiological migration of hemopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001; **294**: 1933–1936.
- [65] WYSOCZYNSKI M, RECA R, RATAJCZAK J et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; **105**: 40–48.
- [66] YILMAZ OH, VALDEZ R, THEISEN BK et al. Pten dependence distinguishes hemopoietic stem cells from leukemia-initiating cells. *Nature* 2006; **441**: 475–482
- [67] ZUBA-SURMA EK, KUCIA M, ABDEL-LATIF A et al. Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (VSELs) by ImageStream system analysis. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 292–303.
- [68] ZUBA-SURMA EK, WU W, RATAJCZAK J et al. Very small embryonic-like stem cells in adult tissues – potential implications for aging. *Mech Ageing Dev* 2009; **130**: 58–66.

Jerzy Kawiak, Zakład Cytologii Klinicznej,  
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa  
e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl