

MAŁE KOMÓRKI MACIERZYTE PRZYPOMINAJĄCE KOMÓRKI EMBRYONALNE IZOLOWANE Z TKANEK DOROSŁYCH – OBECNY STAN BADAŃ*

VERY SMALL EMBRYONIC LIKE STEM CELLS (VSELS)
ISOLATED FROM ADULT TISSUES – AN UPDATE

Izabella KLICH¹, Stanisława WALAT², Janina RATAJCZAK¹, Magda KUCIA¹,
Mariusz Z. RATAJCZAK^{1,2}

¹Instytut Komórki Macierzystej, Centrum Rakowe im. Jamesa Grahama Browna,
Uniwersytet Louisville, USA oraz ²Zakład Fizjologii Katedry Fizjopatologii
Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Streszczenie: Najnowsze badania wskazują, że pluripotencjalne komórki macierzyste (PKM) występują w tkankach dorosłych organizmów. Należą do nich m.in. wyizolowane ze szpiku kostnego i innych narządów tzw. małe embrionalno-podobne komórki macierzyste – VSELS (ang. *Very Small Embryonic-Like Stem cells*). Cechą charakterystyczną komórek VSELS jest ekspresja markerów typowych dla pluripotencjalnych komórek epiblastu, które to we wczesnych etapach embriogenezy podczas gastrulacji uczestniczą w formowaniu listków zarodkowych i dają początek różnym liniom komórkowym. Uważamy, że komórki VSELS deponowane stopniowo w rozwijających się tkankach odgrywają ważną rolę w utrzymaniu puli tkankowo specyficznych komórek macierzystych. Stanowią one pierwotne źródło wszystkich komórek rozwijającego się organizmu podczas ontogenezy, przeżywają w dojrzałych tkankach i tym samym pozostają źródłem ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanek i narządów (np. w zawale mięśnia sercowego, udarze mózgu) VSELS mogą być mobilizowane i krążyć we krwi obwodowej. Ponadto jak wykazano, modyfikacja metylacji niektórych genów wykazujących piętno genomowe chroni VSELS przed niekontrolowaną proliferacją i tworzeniem potworników. Zaburzenie tego procesu w sytuacjach patologicznych może prowadzić do udziału VSELS w rozwoju niektórych typów nowotworów (np. potworniaków, guzów germinalnych, mięsaków wieku dziecięcego).

Słowa kluczowe: VSELS, Oct-4, komórki pluripotencjalne, regeneracja, „plastyczność”.

Summary: Accumulating evidence demonstrates that adult tissues contain a population of very primitive pluripotent stem cells and recently, our group identified a population of very small stem cells in murine bone marrow and other adult organs that express several markers characteristic for epiblast/germ line-derived cells. We named these rare cells „very small embryonic/epiblast like stem cells (VSELS)”. We

*Finansowane z grantu KBN (N N401 024536).

hypothesized that these cells, which are deposited during early gastrulation in developing tissues/organs, play an important role in the turnover of tissue-specific/committed stem cells. Based on this, we envision that germ line is not only the origin but also a „basis/skeleton” for the stem cell compartment in adult life forms. We noticed that VSELs could be mobilized into peripheral blood and the number of these cells circulating in peripheral blood increases during stress and tissue/organ injuries (e.g., heart infarct, stroke). Furthermore, our data indicate that VSELs are protected from uncontrolled proliferation and teratoma formation by a unique pattern of methylation of selected somatic imprinted genes. Finally, we envision that, in pathological situations, VSELs could be involved in development of some malignancies (e.g., teratomas, germinal tumors, pediatric sarcomas).

Key words: VSELs, Oct-4, pluripotent stem cells, regeneration, „plasticity”.

WSTĘP

Mianem komórki macierzystej (KM) określa się komórkę mającą zdolność do samoodnawiania oraz różnicowania się w komórki potomne. Przytoczona definicja jest jednak zbyt ogólna i mało precyzyjna. Zidentyfikowano bowiem wiele rodzajów komórek macierzystych różniących się potencjałem proliferacyjnym oraz zdolnością do różnicowania. Ta niejednorodność populacji KM powoduje, że trudno je jednoznacznie opisać wspólną definicją. Pula KM utrzymując w równowadze liczbę komórek somatycznych w organizmie jest odpowiedzialna za odnawianie puli komórek somatycznych, a w konsekwencji za odmładzanie i regenerację narządów i tkanek. Szereg laboratoriów pracuje nad efektywnym pozyskiwaniem komórek macierzystych i opracowaniem warunków ich ekspansji w hodowlach *in vitro*. Rozwijane technologie przynoszą nadzieję na postęp w optymalizacji klinicznego wykorzystania KM w terapii. Komórki te stają się niejako kluczem do długowieczności i znajdują coraz szersze zastosowanie w rozwijającej się nowej dyscyplinie klinicznej, jaką jest medycyna regeneracyjna.

Podstawowym założeniem medycyny regeneracyjnej jest wykorzystanie KM w terapii uszkodzonych narządów i tkanek. Transplantacje narządów, jak się wydaje, będą w przyszłości coraz częściej zastępowane przeszczepami zawiesiny swoistych dla danego narządu komórek macierzystych, mających za zadanie regenerację/odbudowę uszkodzonych tkanek. Szczególne nadzieje na wykorzystanie terapeutyczne KM wiążą się z takimi schorzeniami, jak: zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, parkinsonizm, cukrzyca, dystrofia mięśniowa, toksyczne uszkodzenia wątroby i nerek.

POTENCJALNE ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO REGENERACJI TKANKOWO-NARZĄDOWEJ

Już od około 40 lat wykorzystuje się krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) szpiku kostnego w leczeniu szeregu chorób układu krwiotwórczego. Coraz częściej stosuje się również komórki macierzyste naskórka w leczeniu oparzeń powłok skórnych oraz w celu usprawnienia procesu gojenia troficznymi owrzodzeń tkanek miękkich kończyn. Zaawansowana jest też technologia pozyskiwania macierzystych

komórek mezenchymalnych dla leczenia ubytków kostnych. Pozyskiwanie komórek macierzystych krwiotwórczych naskórka, jak i mezenchymalnych na potrzeby kliniczne jest dziś stosunkowo łatwe. Znacznie trudniej jest natomiast uzyskać od zdrowych dawców komórki macierzyste innych tkanek i narządów w liczbie pozwalającej na ich potencjalne wykorzystanie terapeutyczne. To istotne ograniczenie dotyczy m.in. mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby, wysp endokrynnych trzustki, ośrodkowego układu nerwowego. W związku z powyższym, w ostatnich latach duże nadzieje wzbudziła teoria „plastyczności” krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) lub ich zdolności do transróżnicowania. Zgodnie z jej podstawowym założeniem, KKM pozyskane np. ze szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej lub krwi pępowinowej, skąd stosunkowo łatwo je wyizolować, miałyby być zdolne do odróżnicowania się w komórki macierzyste swoiste dla innych narządów, np. mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego lub wątroby. Analiza badań przeprowadzonych w różnych ośrodkach nasuwa jednak obawy, że postulowana przez niektórych badaczy „plastyczność” KKM w rzeczywistości była prawdopodobnie wynikiem artefaktów doświadczalnych.

KOMÓRKI NIEHEMATOPOETYCZNE SZPIKU KOSTNEGO – LEKCJA WYPLÝWAJĄCA ZE ZJAWISKA „PLASTYCZNOŚCI” KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (KKM)

Jak powyżej wspomniano, duże nadzieje pokładano w potencjalnym wykorzystaniu w medycynie regeneracyjnej KKM izolowanych ze szpiku kostnego, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej. Oczekiwania te opierały się na wspomnianym powyżej zjawisku „plastyczności” przypisywanym tym komórkom i zdolności do transróżnicowania w komórki różnych linii niehematopoetycznych. Teorię „plastyczności” KKM wspierały wyniki niektórych pozytywnych badań nad wykorzystaniem tych komórek w zwierzęcych modelach zawału mięśnia sercowego [40, 79], udaru mózgu [7, 72, 117], mechanicznego uszkodzenia rdzenia kręgowego [47] oraz toksycznego uszkodzenia wątroby [58]. Pomimo obiecujących wyników przytoczonych powyżej badań, rola KKM w regeneracji uszkodzonych narządów nadal jednak nie jest jednoznacznie określona, a jej ocena budzi kontrowersje [15, 108]. Seria nowych badań z zastosowaniem fenotypowo zdefiniowanych i oczyszczonych subpopulacji KKM przyniosła bowiem negatywne wyniki w modelach regeneracji mięśnia sercowego [6, 76] oraz mózgu [11]. Te nieoczekiwane obserwacje podważyły koncepcję „plastyczności” komórek macierzystych układu krwiotwórczego [15, 35]. Wspomniane niezgodności i rozbieżności w wynikach opublikowanych badań mogą być konsekwencją zastosowania przez laboratoria różnych doświadczalnych modeli uszkodzenia tkanek, jak również trudności w wykrywaniu w organizmie biorcy komórek pochodzących od dawcy, czyli w ocenie tzw. chimeryzmu komórkowego. W tabeli 1 zestawiono alternatywne wyjaśnienia postulowanego zjawiska „plastyczności” KKM.

Po pierwsze, wykazanie „plastyczności” KKM może wymagać zastosowania odpowiednich modeli uszkodzenia tkanek prowadzących do indukcji w mikrośrodo-wisku czynników sprzyjających potencjalnemu wystąpieniu tego zjawiska. Hipotetycz-nie, tego typu sprzyjające warunki mogłyby dotyczyć zmian epigenetycznych w KKM, stymulujących je do różnicowania się w kierunku komórek linii innych niż hematopoetyczna [13, 75]. Po drugie, na podstawie opublikowanych doniesień, „plastyczność” KKM może być wyjaśniona fenomenem fuzji komórkowej [2, 39, 104, 109, 115]. Według tej teorii, przeszczepione KKM mogłyby ulegać fuzji z komórkami uszkodzonych narządów. Komórki budujące dany narząd stawałyby się heterokarionami wykazującymi ekspresję markerów komórek zarówno przeszczepu, jak i tkanek gospodarza. Warto nadmienić jednak, że zarówno fuzja komórkowa, jak i zmiany epigenetyczne zachodzące w komórkach po przeszczepie należą do bardzo rzadko występujących, 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 tzw. chimeryzmu komórkowego obserwowanego po przeszczepie KKM [30, 41, 113]. Kolejnym możliwym wytłumaczeniem pozytywnych efektów terapeutycznych uzyskanych w próbach regeneracji tkanek i narządów po zastosowaniu przeszczepu komórek szpiku kostnego może być ich wpływ parakryny na komórki uszkodzonego organu. Macierzyste komórki hematopoetyczne są bowiem źródłem wielu czynników wzrostowych oraz cytokin, które wydzielone przez przeszczepione komórki *in situ* w miejscu uszkodzenia mogą promować procesy regeneracyjne oraz waskularyzację uszkodzonych tkanek [87]. Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość modyfikacji fenotypu komórek w następstwie przeniesienia między sąsiadującymi komórkami receptorów komórkowych, białek cytoplazmatycznych oraz mRNA za pomocą mikrofragmentów komórkowych (ang. *microvesicles*). Mikrofragmenty komórkowe są kulistymi strukturami, w których część cytoplazmy jest otoczona błoną komórkową [1, 86, 88, 89]. Złuszczenie mikrofragmentów z powierzchni błony komórkowej opisane zostało jako zjawisko fizjologiczne towarzyszące wzrostowi komórek; potwierdzono je także w stanach aktywacji komórek w takich procesach, jak np. niedotlenienie tkanek czy ich uszkodzenie [14, 74, 107]. W związku z tym, wspomniane przeniesienie receptorów powierzchniowych, białek oraz informacji genetycznej pod postacią mRNA pomiędzy wszczepionymi KKM szpiku kostnego a komórkami gospodarza mogłoby przejściowo prowadzić do zmiany fenotypu komórek uszkodzonego organu. Wciąż pozostaje niewyjaśnione, czy mikrofragmenty komórkowe mogą także przenosić niektóre markery reporterowe stosowane do wykrywania chimeryzmu, takie jak np. białko wykazujące zieloną fluorescencję – GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*) czy β -galaktozydazę.

Najważniejsze wydaje się jednak, że w trakcie badań mających na celu wyjaśnienie „plastyczności” komórek macierzystych oraz udziału pierwotnych komórek szpikowych w regeneracji uszkodzonych narządów (tab. 1), nie wzięto pod uwagę możliwości, że populacja komórek macierzystych obecnych w szpiku kostnym nie

TABELA 1. Alternatywne wyjaśnienia zjawiska transróżnicowania lub "plastyczności" krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM)

TABLE 1. Alternative explanations of the phenomenon of trans-dedifferentiation of "plasticity" of hematopoietic stem cells (HSCs)

Zmiany epigenetyczne	Czynniki środowiskowe uszkodzające tkanki/organy mogą indukować zmiany epigenetyczne w genach regulujących pluripotencję KKM (powodując zmiany w metylacji DNA, acetylację histonów). Konieczne jest zgromadzenie dalszych dowodów, by potwierdzić powszechność tego zjawiska
Fuzja komórkowa	Bardzo rzadko występujące zjawisko, w którym przeszczepione KKM ulegają fuzji z komórkami uszkodzonej tkanki, tworząc heterokariony. Powstałe heterokariony wykazują ekspresję markerów KKM przeszczepu uszkodzonych komórek tkanek gospodarza (pseudochimeryzm)
Stymulacja parakrylna	KKM stanowią źródło różnych czynników wzrostowych i angiopoetycznych, mogących promować regenerację tkanek/organów
Przeniesienie białek przez mikrofragmenty błonowe	Niektóre doniesienia o "plastyczności" komórek macierzystych mogą być wyjaśnione za pomocą zjawiska czasowej zmiany fenotypu komórkowego, będącego wynikiem przeniesienia receptorów, cytoplazmatycznych białek oraz mRNA między KKM a uszkodzoną komórką, za pomocą mikrofragmentów błonowych
Obecność heterogenicznej populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym	Oprócz KKM, szpik kostny zawiera także populacje innych 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). Może to tłumaczyć brak efektu "plastyczności" przy zastosowaniu dokładnie oczyszczonej populacji KKM

jest jednorodna [53]. Uważamy, że nieuwzględnienie możliwej heterogenności KM oraz brak odpowiednich kontroli w prowadzonych badaniach nad regeneracją tkanek niehematopoetycznych z zastosowaniem przeszczepianych komórek szpiku kostnego oraz krwi pępowinowej było źródłem wielu nieścisłości i doprowadziło do niewłaściwych interpretacji obserwowanych zjawisk. Zgodnie z powyższym uważamy, że najlepszym wyjaśnieniem postulowanej „plastyczności” KKM jest obecność w szpiku kostnym, mobilizowanej krwi obwodowej oraz krwi pępowinowej heterogenicznej populacji komórek macierzystych. Obecne w puli przeszczepionych KKM inne komórki macierzyste brałyby więc udział w regeneracji uszkodzonych tkanek gospodarza, co może tłumaczyć obserwowane zjawiska opisywane jako „plastyczność” czy zdolność do transróżnicowania KKM [53]. Występowanie niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym wyjaśnia więc lepiej niż transróżnicowanie KKM pozytywne wyniki badań nad „plastycznością” KKM uzyskane przez badaczy, którzy stosowali komórki szpikowe w regeneracji uszkodzonych narządów [7, 40, 72, 79]. Co więcej, w przypadkach, kiedy stosowano wyselekcjonowane, oczyszczone pule KKM, komórki macierzyste niehematopoetyczne prawdopodobnie były eliminowane na etapie izolacji komórek do przeszczepu; przeszczepiane komórki nie różnicowały się wówczas w komórki innych tkanek i tym samym nie obserwowano zjawiska „plastyczności” [108].

Podsumowując, na obecnym etapie badań zjawisko transróżnicowania KKM w komórki linii niehematopoetycznych oraz ich udział w regeneracji uszkodzonych tkanek nadal pozostają wątpliwe i bardzo słabo udokumentowane. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem pozytywnych wyników badań nad „plastycznością” jest występowanie w szpiku kostnym różnorodnych populacji komórek macierzystych, w tym i pluripotencjalnych komórek macierzystych. Zagadnienie to zostanie omówione poniżej.

DOWODY NA RÓŻNORODNOŚĆ KOMÓREK MACIERZYSTYCH SZPIKU KOSTNEGO – OBECNOŚĆ NIEHEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Obecność niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym potwierdzają wyniki obserwacji świadczące o udziale komórek szpiku kostnego w regeneracji narządów i tkanek [9, 78, 90]. W tabeli 2 zestawiono charakterystyczne cechy fenotypowe różnych rodzajów niehematopoetycznych komórek macierzystych, które zidentyfikowano w szpiku kostnym. Nie można wykluczyć, że różni badacze stosując różne strategie izolacji opisywali w rzeczywistości „zbliżone” populacje komórek macierzystych, nadając im różne nazwy. Poniżej krótko opisano charakterystykę tych populacji oraz występujące pomiędzy nimi podobieństwa.

Komórki progenitorowe śródbłonna naczyń – EPC (ang. *Endothelial Progenitor Cells*). Podano, że szpik kostny zarówno myszy, jak i człowieka zawiera m.in. prekursorzy śródbłonna [4, 5]. Co więcej, zaobserwowano, iż wspomniane rezydujące EPC mogą być uwolnione ze szpiku do krwiobiegu i brać udział w procesach waskularyzacji towarzyszących naprawie uszkodzonych organów [45, 97, 98, 103]. Określenie stopnia udziału EPC pochodzących ze szpiku w waskularyzacji narządów wciąż jednak wymaga dalszych badań.

Mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne – MSC (ang. *Mesenchymal Stem Cells; Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*). MSC stanowią populację fibroblastów szpiku kostnego, będących podstawowymi komórkami zapewniającymi odpowiednie mikrośrodowisko dla wzrostu i różnicowania KKM [22, 23, 84]. Ponadto, zdolne są one do różnicowania w komórki tkanek mezenchymalnych, takich jak: tkanka łączna właściwa, tłuszczowa, kostna, chrzęstna oraz więzadeł i ścięgien [10, 84]. Nie można wykluczyć jednak, że izolowane populacje MSC zawierają również inne niehematopoetyczne komórki macierzyste. Taka możliwość powinna być brana pod uwagę przy interpretacji wyników wskazujących na transróżnicowanie MSC w komórki pochodzące z innych niż mezoderma listków zarodkowych (np. w pochodzące z ektodermy komórki nerwowe). W związku z licznymi rozbieżnościami towarzystwo *International Society for Cellular Therapy* zaproponowało niedawno unikanie sformułowania „komórki macierzyste” (*stem cells*) w odniesieniu do MSC, proponując ich alternatywną nazwę – „multipotencjalne mezenchymalne komórki stromalne” [36].

TABELA 2. Fenotypowe cechy niehematopoetycznych komórek macierzystych zidentyfikowanych i wyizolowanych ze szpiku kostnego

TABLE 2. Nonhematopoietic stem cells identified in the bone marrow

Komórki macierzyste	Fenotyp
Komórki progenitorowe śródbłonka (EPC – <i>Endothelial Progenitor Cells</i>)	Ludzkie - CD133 ⁺ , CD34 ⁺ , c-kit (CD117) ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , VEGFR2 ⁺ , CD146 ⁺ , vWF ⁺ , CD31 ⁺ Mysie - Sca-1 ⁺ , c-Kit (CD117) ⁺ , Lin ⁻ , VEGFR2 ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , Tie2 ⁺ , CD146 ⁺ , vWF ⁺ , CD31 ⁺
Komórki macierzyste mezenchymalne (MSC – <i>Mesenchymal Stem Cells</i>)*	Kryteria wg <i>International Society for Cellular Therapy</i> : CD105 ⁺ , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , CD45 ⁻ , CD34 ⁻ , CD14 ⁻ , CD11b ⁻ , CD79a ⁻ , CD19 ⁻ , HLA-DR ⁻
Multipotencjalne dojrzałe komórki progenitorowe (MAPC – <i>Multipotent Adult Progenitor Cells</i>)*	SSEA-1 ⁺ , CD13 ⁺ , Flk-1 ^{low} , Thy-1 ^{low} , CD34 ⁻ , CD44 ⁻ , CD45 ⁻ , CD117(c-kit) ⁻ , MHC I ⁻ , MHC II ⁻
Komórki MIAMI (MIAMI – <i>Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible Cells</i>)*	CD29 ⁺ , CD63 ⁺ , CD81 ⁺ , CD122 ⁺ , CD164 ⁺ , c-met ⁺ , BMPR1B ⁺ , NTRK3 ⁺ , CD34 ⁻ , CD36 ⁻ , CD45 ⁻ , D117 (c-kit) ⁻ , HLA-DR ⁻
Bardzo małe komórki macierzyste podobne do komórek embrjonalnych (VSELS – <i>Very Small Embryonic Like Stem cells</i>)	CXCR4 ⁺ , AC133 ⁺ , CD34 ⁺ , SSEA-1 ⁺ (mysz), SSEA-4 ⁺ (człowiek), AP ⁺ , c-met ⁺ , LIF-R ⁺ , CD45 ⁻ , Lin ⁻ , MHC I ⁻ , HLA-DR ⁻ , CD90 ⁻ , CD29 ⁻ , CD105 ⁻

* (fenotyp komórek po ekspansji/ fenotyp komórek adherentnych w hodowli)

Skróty: AP -- płodowy typ alkalicznej fosfatazy; BMPR1 -- receptor typu 1B dla BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*); LIF-R -- receptor dla LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*); NTRK3 – receptor typu 3 dla eurotropowej kinazy tyrozynowej; vW -- czynnik von Willebranda

Multipotencjalne komórki progenitorowe – MAPC (ang. *Multipotent Adult Progenitor Cells*). Komórki MAPC wyizolowane zostały jako frakcja adherentnych komórek jednojądrowych szpiku kostnego o fenotypie CD45⁻ GPA-A⁻ oraz morfologii zbliżonej do MSC [42]. MAPC pozostają jak dotąd jedyną populacją szpikowych komórek macierzystych, która po wstrzyknięciu do rozwijającej się blastocysty może uczestniczyć w tworzeniu komórek wszystkich trzech listków zarodkowych. Komplementacja rozwoju blastocysty przez te komórki ma wskazywać na ich pluripotencjalność [42]. Powyższa obserwacja wymaga jednak potwierdzenia przez inne niezależne laboratoria.

Komórki MIAMI (ang. *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible cells*). Populacja komórek MIAMI została wyizolowana z frakcji komórek jednojądrowych ludzkiego szpiku kostnego w hodowlach ze zmniejszoną zawartością tlenu, na podłożach zawierających fibronektynę [16]. Komórki MIAMI izolowano ze szpiku kostnego osób w różnym wieku, od 3. do 72. roku życia. Linie komórkowe wypracowane z MIAMI wykazywały *in vitro* ekspresję licznych markerów komórek należących do trzech listków zarodkowych, co wskazywać może na ich pluripotencję. Jednakże udział tych komórek w komplementacji rozwijającej się blastocysty nie był

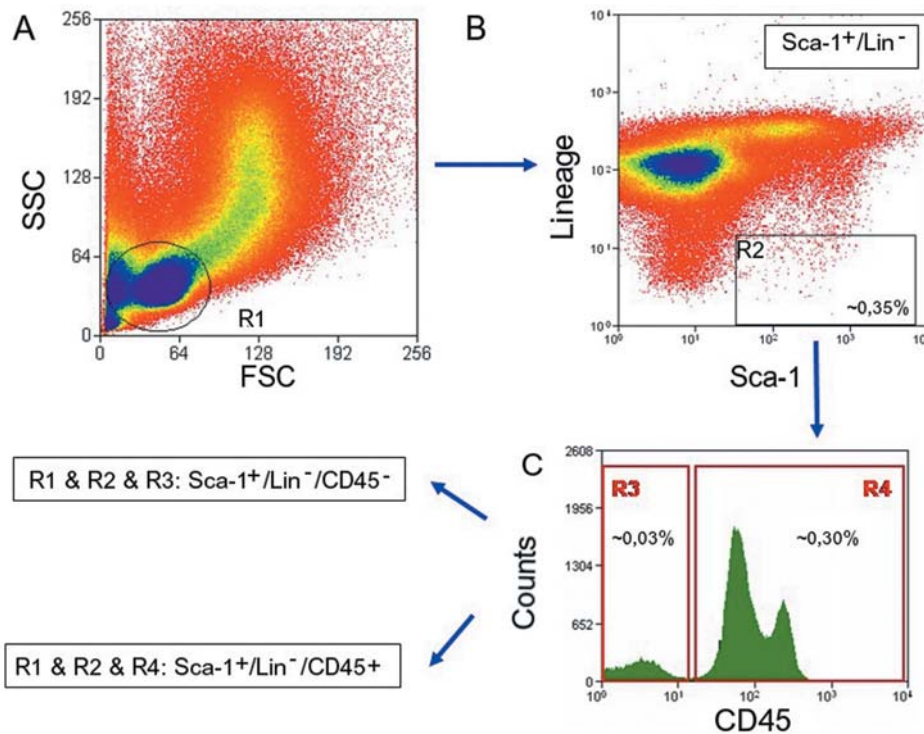
dotychczas badany, podobnie jak i potencjalny związek między MIAMI oraz wspomnianymi powyżej komórkami MAPC. Jest wysoce prawdopodobne, że stanowią one populacje podobnych komórek izolowanych za pomocą różnych strategii badawczych.

SZPIK KOSTNY JAKO ŹRÓDŁO PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH – IDENTYFIKACJA BARDZO MAŁYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH PRZYPOMINAJĄCYCH KOMÓRKI EMBRIONALNE – VSELs

Kilka lat temu zespół nasz zaproponował alternatywne wyjaśnienie zjawiska „plastyczności” KKM. Założyliśmy, jak powyżej wspomniano, że szpik kostny jest źródłem heterogenicznych populacji komórek macierzystych i obok KKM zawiera także pluripotencjalne komórki macierzyste (PKM) mające zdolność różnicowania się w rozmaite tkanki [53, 90].

Komórki o takich właściwościach udało się nam ostatnio zidentyfikować i wyizolować ze szpiku kostnego [53, 90]. Strategię izolacji wspomnianej populacji bardzo małych Sca-1⁺ CD45⁻ lin⁻ komórek z mysiego szpiku kostnego z zastosowaniem FACS (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorter*) zobrazowano na rycinie 1. Badania na poziomie mRNA wykazały obecność w tych komórkach silnej ekspresji wczesnych, tkankowo specyficznych genów regulujących procesy różnicowania w kierunku linii niehematopoetycznych, przy jednoczesnej ekspresji szeregu embrionalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak: Oct-4, Nanog i Rex-1 [52]. Pomocne w wyizolowaniu powyższych komórek były wyniki wstępnych badań sugerujące, że komórki te: 1) będą wykazywały ekspresję receptora CXCR4 (komórki mysie i ludzkie) oraz antygenów CD133 (komórki mysie i ludzkie) i Sca-1 (komórki mysie); 2) będą niehematopoetyczne, a więc CD45⁻ oraz 3) będą bardzo małe (3–4 μm średnicy u myszy i 4–6 μm średnicy u człowieka).

Komórki te, jak wspomniano, wykazują ekspresję szeregu markerów komórek pluripotencjalnych, w tym SSEA-4, Oct-4, Rex-1 i Rif-1, na poziomie zarówno mRNA, jak i białka. Jednocześnie są negatywne pod względem obecności antygenów zgodności tkankowej MHC-I i MHC-II (HLA-DR) oraz białek specyficznych dla linii mezenchymalnej, takich jak: CD90, CD105 i CD29 [51]. Co ważniejsze, komórki te izolowane z mysiego szpiku kostnego w badaniach z zastosowaniem elektronowego mikroskopu transmisyjnego mają cechy charakterystyczne dla komórek embrionalnych, takie jak: obecność dużego jądra komórkowego otoczonego wąskim rąbkim cytoplazmy oraz występowanie luźnej chromatyny (euchromatyny) w jądrze komórkowym. Co najważniejsze, pomimo bardzo małych wymiarów komórki te zawierają prawidłową diploidalną liczbę chromosomów, a także liczne mitochondria. Odznaczają się również wysoką aktywnością telomerazy. Wykorzystując powyższe kryteria, komórki te określiliśmy mianem „bardzo małych komórek macierzystych podobnych do komórek embrionalnych” – VSELs (ang. *Very Small Embryonic-Like stem cells*)



RYCINA 1. Izolacja komórek VSELS ze szpiku kostnego dorosłych myszy za pomocą FACS. Na rycinie zobrazowano strategię izolacji VSELS za pomocą sortowania FACS (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorting*). Komórki szpiku kostnego izolowano z kości udowych i piszczelowych kończyn tylnych 4–8 tygodniowych myszy szczepu C57BL/6. Erytrocyty eliminowano za pomocą lizy, a pełną populację komórek 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 obrazuje rozmieszczenie komórek w zależności od parametrów FSC (ang. *Forward Scatter*) i SSC (ang. *Side Scatter*) komórek, zależnych odpowiednio od wielkości oraz ziarnistości tych komórek. Region R1 zawiera komórki małe (2–8 μm) o morfologii limfocytarnej. Komórki z tego regionu przedstawiono na PANELU B w zależności od ich ekspresji markerów liniowych oraz Sca-1. Komórki o fenotypie $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ analizowano dalej pod względem ekspresji antygeny CD45 (Panel C). VSELS sortowano jako komórki o fenotypie $\text{CD45}^- \text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ (region R3), natomiast KKM, jako $\text{CD45}^+ \text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ (region R4). Wartość procentowa jest tożsama z odsetkową średnią zawartością każdej z populacji wśród wszystkich komórek jednojądrowych szpiku kostnego myszy

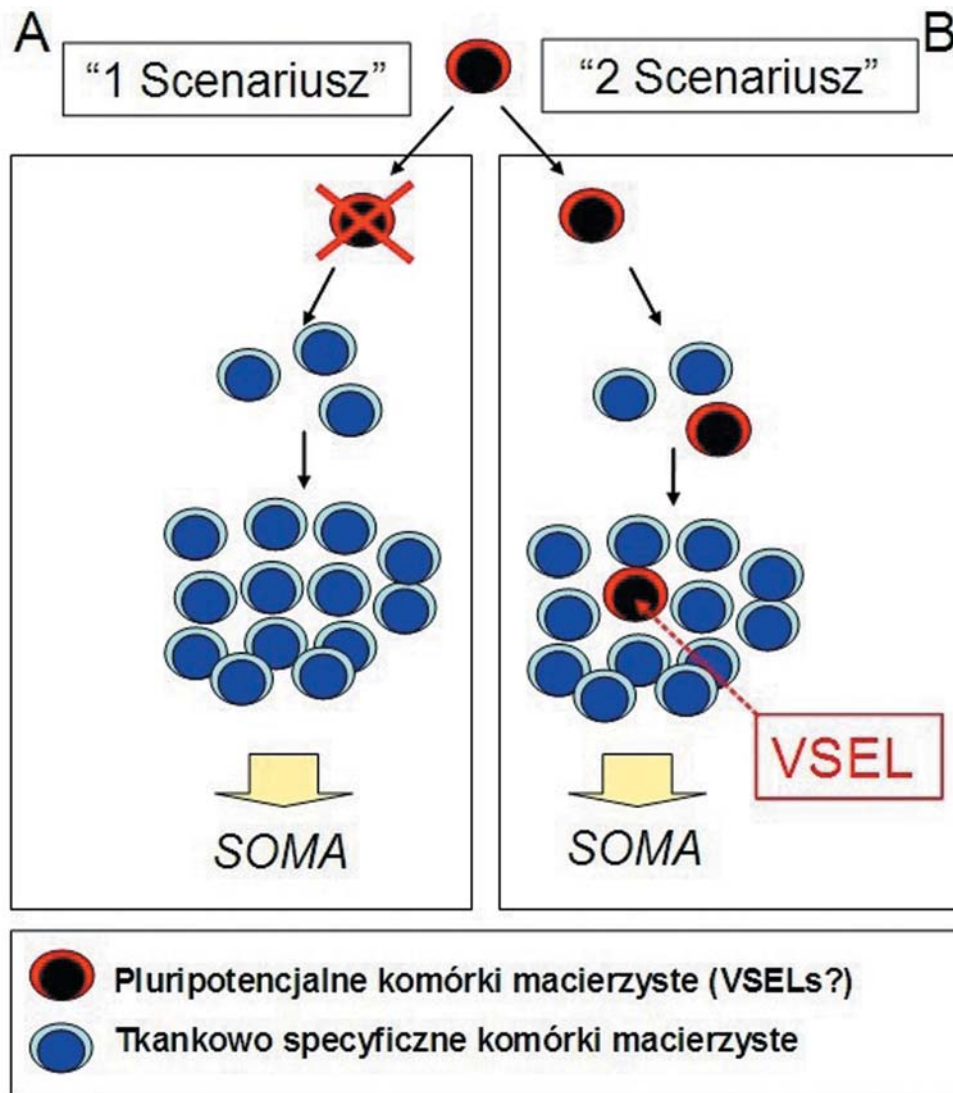
FIGURE 1. Strategy to isolate very small embryonic like cells (VSELS) in the bone marrow derived from adult mice based on FACS sorting. The strategy to isolate very small embryonic like cells (VSELS) based on fluorescence-activated cell sorting (FACS) is shown. VSELS were sorted from bone marrow-mononuclear cells (BMMNCs) derived from 1 to 2-month-old mice of C57BL/6 strain. Erythrocytes were removed by a hypotonic solution (Lysing Buffer, BD Biosciences, San Jose, USA). To label BMMNC, the immunostaining for murine CD45, Sca-1 and lineage markers with specific antibodies conjugated with the fluorochromes (BD Pharmingen, USA) was performed. PANEL A: Cell distribution based on FSC (Forward Scatter) and SSC (Side Scatter) parameters that describe their size and granularity, respectively. Region 1 (R1) contains small cells with a size between 2 and 8 μm and lymphocytic morphology. Cells from R1 region are shown in PANEL B according to their lineage markers and Sca-1 expression. $\text{Sca-1}^+ \text{Lin}^-$ cells were analyzed furthermore based on CD45 antigen expression (PANEL C). VSELS were sorted as population of $\text{CD45}^- \text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ cells (Region R3) and hematopoietic stem cells (HSCs) were sorted as population $\text{CD45}^+ \text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ cells (Region R4). Percent values are equal to mean quantity of each cell population among the all BMMNCs in the murine bone marrow

[52]. Ostatnio, stosując cytometrię przepływową, udało się nam zidentyfikować podobne Sca-1⁺lin⁻CD45⁻ komórki w tkankach większości mysich organów, m.in. w nerkach, płucach, sercu oraz jądrach. Komórki VSELs wyizolowano także z siatkówki oka, wykazując jednocześnie, że mają one podobnie jak komórki szpikowe charakter komórek pluripotencjalnych [64]. Zaobserwowaliśmy, że wielkość VSELs może być różna w zależności od narządu, z którego są izolowane. Komórki spełniające kryteria fenotypowe przyjęte dla populacji mysich VSELs zidentyfikowaliśmy ostatnio w ludzkiej krwi pępowinowej [51], co wskazuje na to, iż mogą występować także w tkankach człowieka.

Wyniki dotychczasowych badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wskazują tym samym, że w większości tkanek dorosłych osobników obecna jest populacja PKM mających szereg cech komórek pierwotnej ektodermy – czyli epiblastu. Jak wiadomo, w prawidłowym rozwoju embrionalnym epiblast daje początek KM specyficznym tkankowo i narządowo. PKM obecne w epiblaście podlegają różnicowaniu, najpierw do multipotencjalnych, a następnie tkankowo specyficznych komórek macierzystych, które biorą udział najpierw w tworzeniu, a następnie w regeneracji i odmładzaniu narządów [70, 92]. Uważamy, że niektóre z tych pierwotnych komórek mogą uniknąć specyfikacji w kierunku bardziej zróżnicowanych KM oraz zachowując swój pluripotencjalny charakter przetrwać u dorosłych osobników pomiędzy zróżnicowanymi tkankowo specyficznymi KM jako populacja komórek VSELs (ryc. 2).

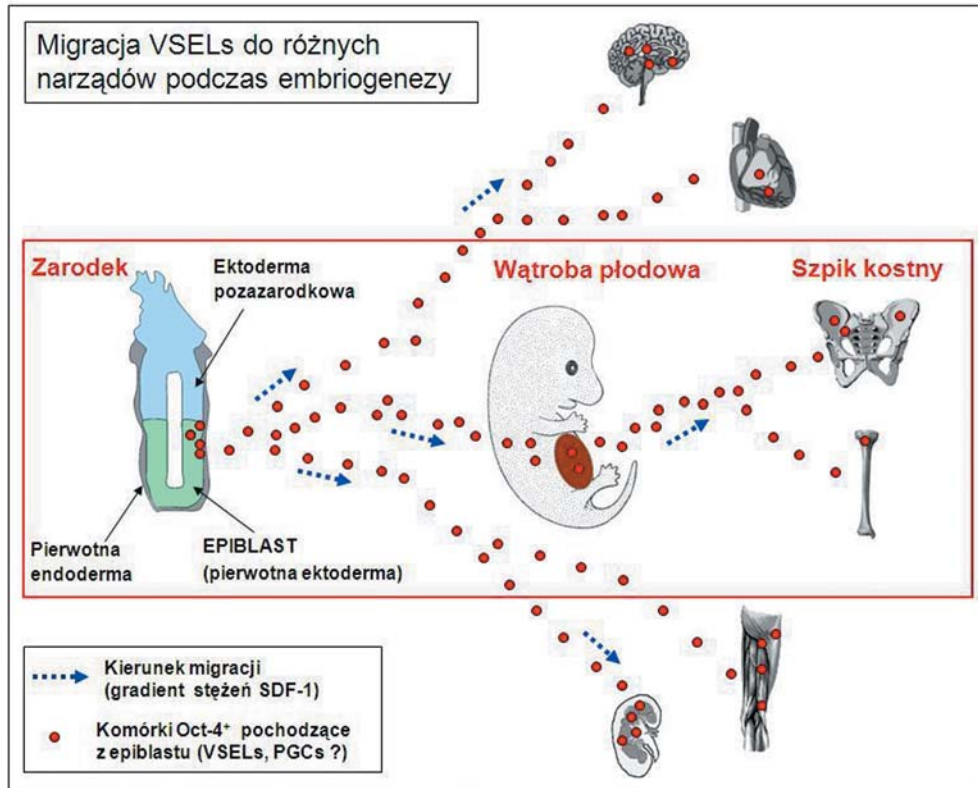
Podsumowując, pochodzące z epiblastu VSELs zostają zdeponowane początkowo w powstających podczas gastrulacji listkach zarodkowych we wczesnych etapach embriogenezy, a następnie w rozwijających się narządach (ryc. 3), gdzie przeżywają do czasu osiągnięcia dojrzałości organizmu [91]. Cechą charakterystyczną tych komórek jest ekspresja genów typowych dla pluripotencjalnych komórek epiblastu, takich jak: SSEA-4, Oct-4 i Nanog. Hipotezę tą potwierdzają publikowane ostatnio dane wskazujące na obecność komórek macierzystych mających markery komórek epiblastu (np. Oct-4, SSEA) nie tylko w szpiku kostnym [3, 52, 81], ale również w tkankach wielu organów niehematopoetycznych, takich jak: naskórek [27], nabłonek oskrzeli [62], mięsień sercowy [71], trzustka [17, 49], jądra [29, 44], miazga zębowa [46], siatkówka [48], a także w płynie owodniowym [19]. Komórki te odpowiadają populacji Oct-4⁺ VSELs. Mogą się one nieznacznie różnić morfologią i wielkością w zależności od typu tkanki, z której są izolowane [55, 91].

Jak wspomniano powyżej, komórki podobne do VSELs zidentyfikowanych uprzednio w mysim szpiku udało się nam ostatnio wyizolować z ludzkiej krwi pępowinowej [51] (tab. 3). Zgromadziliśmy też dowody, że podobna populacja rezyduje w ludzkim szpiku, szczególnie u ludzi w młodym wieku. Uważamy, że VSELs mogą stać się alternatywnym źródłem komórek macierzystych wykorzystywanych w celach terapeutycznych. Warto nadmienić, że komórki te z powodzeniem zostały już zastosowane w regeneracji mięśnia sercowego w eksperymentalnym modelu zawału u myszy [18].



RYCINA 2. Potencjalny udział komórek VSELS w regeneracji tkanek. PANEL A: Liczba VSELS w dojrzałych tkankach może ulegać zmianie w wyniku ich eliminowania wraz ze zwiększaniem liczby tkankowo specyficznych komórek macierzystych wytwarzanych podczas embriogenezy/gastrulacji. PANEL B: Alternatywnie względem panelu A możliwe jest przeżycie komórek VSELS wśród tkankowo specyficznych komórek macierzystych; VSELS mogą stanowić dodatkowe ich źródło

FIGURE 2. Potential VSELS activity in tissue regeneration. PANEL A: The VSELS number in adult tissues can be modified due to their elimination by parallel increase of the quantity of tissue-committed stem and progenitor cells produced in embryogenesis and gastrulation phases of organism development. PANEL B: Contrary to Panel A: possible survival of VSELS among tissue-committed stem and progenitor cells; VSELS seem to be the additional source of tissue-committed stem and progenitor cells



RYCINA 3. Hipoteza obecności embrjonalnych komórek macierzystych epiblastu w dojrzałych tkankach. Obecność VSELS w wątrobie płodowej, szpiku kostnym i innych tkankach można wyjaśnić hipotezą zasiedlania tych organów w wyniku migracji VSELS z epiblastu pod wpływem gradientu stężeń SDF-1. Wątroba płodowa jest najważniejszym organem w szlaku migracyjnym tych komórek
 FIGURE 3. Hypothetical epiblast-derived stem cells (EPSC) existence in adult tissues. Finding of VSELS in fetal liver, bone marrow and other tissues can be interpreted according to the hypothesis of VSELS migration from epiblast to those organs under the SDF-1 gradient. Fetal liver is the most important organ at the migratory pathways of VSELS in a developing organism

PIĘTNO GENOMOWE (IMPRINTING GENOMOWY) JAKO MECHANIZM REGULUJĄCY POTENCJAŁ PROLIFERACYJNY VSELS

Z ewolucyjnego punktu widzenia, komórki linii zarodkowej określane są mianem „nieśmiertelnych” [26, 91, 118]. Pochodzące z linii komórek zarodkowych pierwotne komórki płciowe – PGC (ang. *Primordial Germ Cells*) ewoluują w plemniki i komórki jajowe, które tworzą w procesie zapłodnienia zygotę – najwcześniejszą komórkę linii zarodkowej. Podczas rozwoju embrjonalnego potencjał linii zarodkowej jest zachowany w blastomerach moruli i w komórkach węzła zarodkowego blastocysty. W stadium blastocysty część komórek, które otaczają blastulę, różnicuje się w kierunku komórek trofoblastu dając początek łożysku. Po implantacji blastocysty w macicy komórki pluripotencjalne zlokalizowane są w epiblastie, czyli pierwotnej ektodermie [26, 91, 118].

TABELA 3. Porównanie cech morfologicznych i fenotypowych mysich i ludzkich komórek VSELS
 TABLE 3. Morphologic and phenotypic comparison of murine and human VSELS

Źródło komórek	VSELS szpiku mysiego	VSELS ludzkiej krwi pępowinowej
Wielkość	3–5 μm	4–7 μm
Jądro	duże – zawiera euchromatynę, podwójna liczba chromosomów	duże – zawiera euchromatynę, podwójna liczba chromosomów
Cytoplazma	wąski rąbek cytoplazmy bogaty w mitochondria	wąski rąbek cytoplazmy bogaty w mitochondria
Markery powierzchniowe	Sca-1 ⁺ , CXCR4 ⁺ , CD45 ⁻ , lin ⁻ MHC-I ⁻ HLA-DR ⁻ , CD90 ⁻ CD105 ⁻ CD29 ⁻	CD133 ⁺ , CXCR4 ⁺ , CD45 ⁻ , lin ⁻ , MHC-I ⁻ HLA-DR ⁻ , CD90 ⁻ CD105 ⁻ CD29 ⁻
Markery zarodkowych komórek macierzystych	SSEA-1, Oct-4, Nanog, Rex-1, duża aktywność telomerazy	SSEA-4, Oct-4, Nanog, Rex-1 duża aktywność telomerazy
Różnicowanie <i>in vitro</i>	+	+
Udział w rozwoju zarodka	Nie*	(nieodpowiednie)

* Chronione przez zniesienie somatycznego imprintingu genów

U myszy, w 7. dni po zapłodnieniu – dpc. (ang. *days post-conception*) część PKM epiblastu, określana jako PGC, migruje do listw płciowych, gdzie różnicuje się w oogonia bądź spermatogonia, z których powstają oocyty bądź plemniki [69, 70]. Krótko po specyfikacji PGC, pozostałe PKM epiblastu zaczynają różnicować się w multi/unipotencjalne komórki, z których rozwijają się różne tkanki i narządy [91]. Zakładamy, że w przebiegu różnicowania wywodzące się z epiblastu PKM nie są całkowicie eliminowane z rozwijającego się organizmu. Prawdopodobnie, część tych komórek przeżywa pomiędzy tkankowo specyficznymi komórkami macierzystymi jako populacja VSELS [91].

Jak wiadomo, jednym z podstawowych problemów medycyny regeneracyjnej jest opracowanie efektywnej ekspansji PKM. PKM poddają się ekspansji tylko wtedy, kiedy mają prawidłowy imprinting genomowy (piętno genomowe). Piętno genomowe jest bowiem jednym z mechanizmów, które kontrolują ekspansję i proliferację PKM w dorosłym organizmie i najlepiej zostało poznane właśnie w populacji PGC.

Jak wykazano, PGC wyizolowane z rozwijających się płodów po 11. dniu rozwoju embrionalnego: 1) szybko giną w hodowlach *in vitro*, 2) jądra komórkowe tych komórek nie biorą udziału w tworzeniu klonu podczas transferu jądrowego do enukleowanej komórki jajowej, 3) nie tworzą potworniaków po wstrzyknięciu zwierzętom doświadczalnym i 4) nie komplementują rozwoju zarodka po iniekcji do rozwijającej się blastocysty [20, 66, 77, 91, 114]. Tak więc, ta najważniejsza populacja KM odpowiedzialna za przenoszenie informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie nie wykazuje tych wszystkich cech, które tradycyjnie przypisuje się PKM. Za stan ten odpowiedzialne jest usunięcie piętna genomowego (ang. *somatic imprint*) na ważnych rozwojowo genach [77, 91, 114].

Piętno genomowe polega na różnym stopniu metylacji niektórych genów w komórkach jajowych i plemnikach [59, 67]. Gen jest metylowany (naznaczony) na

allelu pochodzącym tylko od jednego z rodziców. Do tej pory poznano np. u myszy około 80 takich genów, które są naznaczone głównie w komórkach rozrodczych żeńskich. Tylko kilka genów jest naznaczanych w gametach męskich (np. *Igf2-H19*, *Rasgrf1*, *Meg3*) [59, 67, 91]. Podczas zapłodnienia, pary odpowiednich genów wykazujących piętno występują w odpowiedniej proporcji w zygocie i piętno to utrzymuje się następnie podczas rozwoju we wszystkich komórkach linii somatycznej.

Odmierna sytuacja występuje w PGC. Usunięcie (demetylacja) jednostek regulatorowych genów wykazujących imprinting następuje podczas migracji PGC do listw płciowych [59, 67]. Usunięcie piętna genomowego w PGC ma powodować, że komórki te, jeśli zmieniają kierunek migracji podczas ich wędrówki do listw płciowych i osiedlą się w innych narządach, nie będą ulegały proliferacji i tworzyły potworniaków. Jest to również ważny mechanizm mający za zadanie kontrolowanie proliferacji tych komórek i zapobiega zjawisku dzieworództwa (partenogenezy). Piętno genomowe zostanie ponownie odbudowane w komórkach gamet w jądrach i jajnikach po pierwszym podziale mejotycznym, gdy liczba DNA zostanie zredukowana do połowy tak, aby diploidalna zygota powstająca w wyniku zapłodnienia miała prawidłowy wzrost metylacji genów pochodzących od samca i samicy.

Jeśli jednak PGC, w których doszło już do usunięcia piętna genomowego, umieszczone zostaną w hodowli na warstwie mysich fibroblastów płodowych w obecności wyselekcjonowanych czynników wzrostu np. czynnika hamującego białaczkę – LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów – bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*) i liganda receptora c-kit, mogą one ulec zmianom epigenetycznym i odzyskać prawidłowy wzór somatyczny piętnowanych genów [25, 93]. Powstają wtedy „unieśmiertelnione” embrionalne komórki płciowe – EGC (ang. *Embryonic Germ Cells*) [68, 118], mające właściwości PKM. EGC w przeciwieństwie do PGC: 1) różnicują się w hodowlach *in vitro* w komórki pochodzące potencjalnie z trzech listków zarodkowych, 2) jądra komórkowe tych komórek biorą udział w tworzeniu klonu podczas transferu jądrowego do enukleowanej komórki jajowej, 3) dają początek potworniakom po wstrzyknięciu zwierzętom doświadczalnym oraz 4) komplementują rozwój zarodka po iniekcji do rozwijającej się blastocysty. Ta zmiana właściwości biologicznych PGC po transformacji w EGC wiąże się, jak wspomniano powyżej, z odtworzeniem prawidłowego piętna genomowego. Tak więc proces ten ma charakter odwracalny i w niektórych warunkach może zostać odtworzony.

Ostatnio wykazaliśmy, że podobne zjawisko, jakie opisano dla PGC, zachodzi także w VSELs i kontroluje proliferację tych komórek. Stwierdziliśmy bowiem, że usunięcie imprintingu genomowego na niektórych genach (*Igf2-H19*, *Rasgrf1*) VSELs jest odpowiedzialne za to, że komórki te w dojrzałych tkankach pozostają w stanie „uśpiania”. Chroni to organizm przed powstawaniem potworniaków [55, 91]. Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku PGC, proces ten w „sprzyjających warunkach epigenetycznych” jest odwracalny. Dlatego też pracujemy nad strategią prowadzącą do przywrócenia właściwego somatycznego imprintingu w VSELs. Uważamy, że VSELs po przywróceniu prawidłowego piętna genomowego mogłyby potencjalnie stać się alternatywą dla komórek embrionalnych pozyskiwanych z

plodów, czy też tzw. indukowanych PKM otrzymywanych w wyniku transformacji komórek somatycznych [55, 91, 102, 110].

RÓŻNICOWANIE MYSICH VSELS *IN VITRO*

Zidentyfikowane i opisane przez naszą grupę VSELS stanowią bardzo małą liczebnie populację komórek obecnych w szpiku kostnym dorosłych osobników (1 komórka VSELS na ok. 10^4 – 10^5 komórek jednojądrowych mysiego szpiku) [52]. Z obserwacji naszych wynika także, że szpik kostny młodych myszy zawiera więcej komórek o fenotypie VSELS, a liczba tych komórek maleje z wiekiem osobnika [52]. Mając na uwadze potencjalne wykorzystanie tych komórek do celów terapeutycznych niezbędnym wydaje się szybkie opracowanie skutecznej metody ich ekspansji *ex vivo*.

Prowadzimy więc intensywne badania nad opracowaniem składu skutecznego „koktajlu” różnych czynników wzrostowych stymulujących proliferację VSELS. Nasze dotychczasowe obserwacje wskazują, że VSELS wymagają do proliferacji nie tylko środowiska 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 potencjalnie do trzech listków zarodkowych, tj. kardiomiocyty (mezoderma), różne rodzaje komórek nerwowych (ektoderma) oraz komórki trzustki syntetyzujące insulinę (endoderma) [52]. W hodowlach na komórkach linii stromalnej OP-9 VSELS różnicują się w kierunku komórek hematopoetycznych. Stwierdziliśmy również, że w hodowli z mysimi komórkami linii mioblastycznej C2C12 około 5–10% VSELS tworzy sfery przypominające kule zarodkowe. Komórki znajdujące się w takich sferach wykazują aktywność płodowej formy fosfatazy alkalicznej [52] oraz wykazują cechy komórek niedojrzałych – zawierają duże jądro komórkowe wypełnione euchromatyną. Ponadto, jeśli zostaną wyizolowane i umieszczone w odpowiednim medium różnicującym, przekształcają się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. Obecnie nasza grupa prowadzi także intensywne badania potencjału regeneracyjnego komórek pochodzących ze wspomnianych sfer w różnych zwierzęcych modelach uszkodzenia tkanek *in vivo*.

SZPIK KOSTNY JAKO ŹRÓDŁO KRAŻĄCYCH NIEHEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

W warunkach fizjologicznych niewielka liczba KKM stanowi pulę krążącą we krwi obwodowej powstającą w wyniku samoodnawiania się komórek macierzystych w niszach szpikowych i utrzymującą równowagę puli komórek macierzystych w innych, oddalonych niszach szpiku kostnego. Uważamy, że krążące komórki macierzyste mogą konkurować o nisze specyficzne dla różnych tkanek i narządów. Zjawisko to może tłumaczyć fakt występowania heterogenicznych populacji komórek

macierzystych w różnych organach, np. obecność KKM w mięśniach szkieletowych. Liczba uwolnionych do krwiobiegu KKM zwiększa się po podaniu chemotaktycznych czynników mobilizujących, takich jak np. czynnik wzrostowy kolonii granulocytów – G-CSF (ang. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) [82] czy też antagonistą receptora CXCR4 – bicyklam AMD3100 [21]. KKM ulegają również mobilizacji w sytuacjach stresowych dla organizmu, np. w hipoksji czy też po uszkodzeniu narządów [103, 105, 111].

Potwierdzono, że również niehematopoetyczne komórki macierzyste szpiku kostnego mogą pokonywać barierę szpikową i krążyć we krwi, m.in. podczas mobilizacji farmakologicznej (G-CSF, AMD3100) lub stresu związanego z uszkodzeniem tkanek czy organów (np. zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, toksyczne uszkodzenie wątroby) [90, 99]. Dlatego zjawisko mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej powinno być postrzegane jako proces uwalniania nie tylko KKM, ale również komórek macierzystych niehematopoetycznych. Co więcej, mobilizacja środkami farmakologicznymi w połączeniu z leukoferezą może znaleźć zastosowanie kliniczne do pozyskiwania obok szpikowych KKM także i pierwotnych komórek niehematopoetycznych.

W tabeli 4 wymieniono niektóre sytuacje kliniczne prowadzące do zwiększenia liczby komórek macierzystych krążących we krwi obwodowej. Zjawisko to obserwowano w przypadkach uszkodzenia mięśni szkieletowych [57, 65, 80] oraz mięśnia sercowego [50, 111], w udarze mózgu [56], skomplikowanych złamaniach kości [28], uszkodzeniach wątroby i nerek [105], niedokrwieniu kończyn [43], a także po transplantacjach wątroby i płuc [60] oraz operacjach na otwartym sercu [73]. Wspomniane krążące komórki szpikowe opisano jako komórki prekursorowe śródbłonna, komórki satelitowe mięśni szkieletowych [57], komórki progenitorowe dla mięśnia sercowego [111], komórek nerwowych i kości [28, 56], a także jako MSC oraz tzw. fibrocyty [8, 83], które prawdopodobnie stanowią funkcjonalnie zmienioną subpopulację MSC.

Dane te wskazują, że podczas uszkodzenia tkanek i narządów niehematopoetyczne komórki macierzyste mobilizowane są ze szpiku kostnego oraz prawdopodobnie z innych niszy tkankowych do krwi obwodowej, gdzie krążą jako potencjalne źródło komórek macierzystych wspomagających regenerację. Krążeniem ich zawiadują uwalniane z uszkodzonych tkanek chemoatraktanty, takie jak: SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*), VEGF, HGF/SF, LIF oraz bFGF [33, 37, 54, 85, 116]. Stwierdzono również, że czynnik transkrypcyjny HIF-1 (*Hypoxia Regulated/Inducible transcription Factor-1*), związany z niedotlenieniem tkanek, ma bardzo znaczący udział w regulacji ekspresji tych ligandów [34, 95]. Promotory genów dla SDF-1, VEGF oraz HGF/SF zawierają bowiem funkcjonalne miejsca wiązania HIF-1 [12, 34, 101, 112]. W ten sposób hipoksja może indukować ekspresję wymienionych czynników odpowiedzialnych za uwalnianie komórek macierzystych ze szpiku, w tym VSELs i ich ukierunkowaną migrację do uszkodzonych tkanek i narządów (ryc. 4).

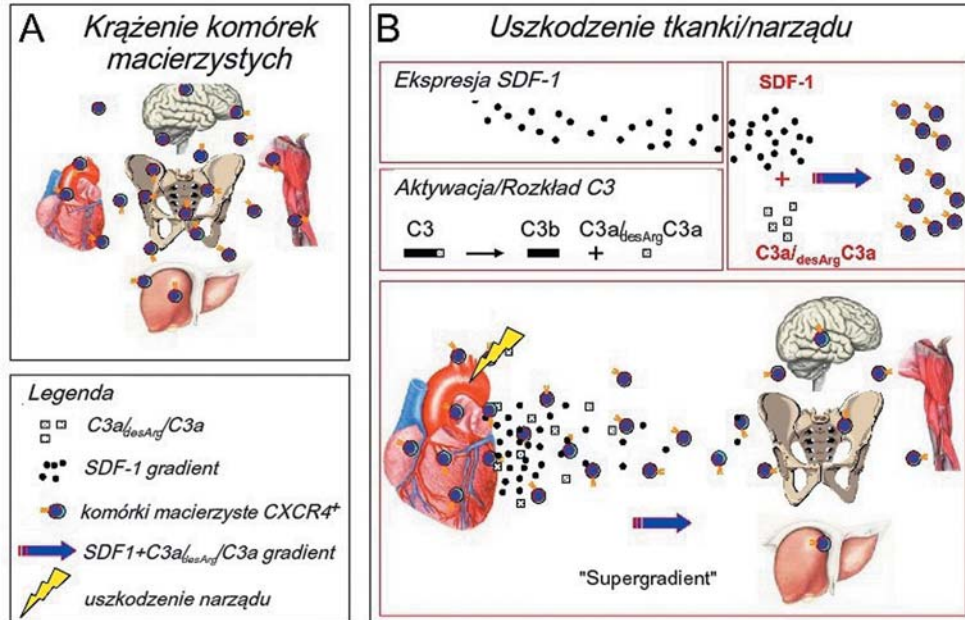
TABELA 4. Dowody na krążenie niehematopoetycznych komórek macierzystych szpiku kostnego w różnych stanach klinicznych

TABLE 4. Proofs for the bone marrow-derived nonhematopoietic stem cells circulation at different pathological states of human organism

Uszkodzenie mięśni szkieletowych	Mysz – komórki macierzyste ze szpiku kostnego zostały opisane jako komórki zasilające pulę komórek satelitowych po przeszczepie do napromienionych mięśni, podobnie szpikowe KM uczestniczyły w regeneracji mięśni szkieletowych uszkodzonych w następstwie intensywnych ćwiczeń fizycznych
Zawał mięśnia sercowego	Człowiek – zwiększenie liczby krążących we krwi komórek CD34 ⁺ , CXCR4 ⁺ , c-Met ⁺ opisano po ostrym zawale mięśnia sercowego. Krążące komórki były wzbogacone w mRNA dla Gata-4, Mef-2C i Nkx2.5/Csx Mysz – Zwiększenie zawartości mRNA dla markerów linii kadiomiocytów: Gata-4, Mef-2C i Nkx.25/Csx, w całej populacji komórek jednojądrowych krwi obwodowej po eksperymentalnie spowodowanym zawale serca
Udar mózgu	Mysz – Zwiększenie zawartości mRNA dla markerów linii neuronalnych: GFAP, Nestyny i β III-tubuliny w całej populacji komórek jednojądrowych krwi obwodowej po eksperymentalnie spowodowanym udarze mózgu
Liczne złamania kości	Człowiek – Zwiększenie zawartości mRNA dla markerów tkanki kostnej (osteokalcyny, alkalicznej fosfatazy, kolagenu typu I) w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej u pacjentów ze skomplikowanymi złamaniami kości
Uszkodzenie wątroby	Mysz – Zwiększenie efektywnego zasiedlenia uszkodzonej (przez ekspozycję na CCl ₄) wątroby myszy NOD/SCID przez ludzkie komórki CD34 ⁺ CXCR4 ⁺
Uszkodzenie nerek	Mysz – Zwiększenie we krwi liczby krążących komórek CD34 ⁺ CXCR4 ⁺ oraz lin ⁺ Sca-1 ⁺ podczas ostrej niewydolności nerek
Przeszczep płuc	Człowiek – Zwiększenie liczby krążących komórek CXCR4 ⁺ cytokeratyna-5 ⁺ we krwi
Operacje na otwartym sercu	Człowiek – Zwiększenie liczby krążących komórek CD34 ⁺ CXCR4 ⁺ we krwi
Przeszczep wątroby	Człowiek – Zwiększenie liczby krążących komórek CD34 ⁺ we krwi oraz zawartości mRNA dla GATA-4, cytokeratyny 19 i α -fetoproteiny w całej populacji komórek jednojądrowych krwi obwodowej
Niedotlenienie kończyn	Mysz – Obecność szpikowych komórek Sca-1 ⁺ FLK-1 ⁺ Tie-2 ⁺ CD34 ⁺ krążących we krwi oraz ich udział w neowaskularyzacji

ROLA PROGENITOROWYCH/MACIERZYSTYCH KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO W PROCESACH PATOLOGICZNYCH

Gromadzone są dowody doświadczalne, że uwalniane i krążące we krwi obwodowej KM mogą odgrywać niekorzystną rolę w szeregu procesów patologicznych [96]. Stwierdzono, że jeśli komórki szpikowe zostaną zmobilizowane w niewłaściwym czasie lub zasiedlą niewłaściwą niszę tkankową (np. obszar tkanki objęty przewlekłym procesem zapalnym), mogą – zamiast wspomagać regenerację – prowadzić do rozwoju zmian patologicznych [94], np. zwłóknienia płuc, pterygii gałki ocznej czy też neuropatii towarzyszącej cukrzycy [31, 32, 100]. Potwierdzono również, że KM pochodzące ze szpiku kostnego mogą brać udział w rozwoju niektórych guzów litych. Wskazują na to wyniki badań dotyczących raka żołądka



RYCINA 4. Koncepcja krążenia niehematopoetycznych komórek macierzystych we krwi obwodowej. PANEL A – Komórki macierzyste mogą krążyć we krwi obwodowej. W warunkach normalnych krąży niewielka ich liczba (głównie krwiotwórcze komórki macierzyste), ale zasobność tej puli KM zwiększa się (w wyniku mobilizacji) podczas uszkodzeń tkankowych i w stanach stresu (np. zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, uszkodzenia wątroby, zapalenia jelit). Mobilizowane KM są przyciągane do uszkodzonych tkanek przez czynniki chemotaktyczne m.in. czynnik wzrostowy pochodzenia stromalnego-1 – SDF-1, czynnik wzrostowy hepatocytów – HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*), czy też czynnik wzrostowy komórek śródbłonna – VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*). Do takiej puli komórek macierzystych ulegających mobilizacji i krążących we krwi podczas uszkodzeń tkankowych należą również zidentyfikowane ostatnio pluripotencjalne komórki macierzyste, jakimi są VSELs. PANEL B – Potencjalny udział komórek VSELs w regeneracji mięśnia sercowego. Podczas zawału mięśnia sercowego ekspresja SDF-1 ulega zwiększeniu w uszkodzonej tkance, a także następuje gromadzenie się fragmentów rozkładu składowej C3 dopełniacza ($C3a$ i $C3a_{desArg}$). Fragmenty dopełniacza wzmacniają/modulują odpowiedź komórek macierzystych $CXCR4^+$ na gradient stężeń SDF-1, co powoduje większą ich efektywność i skuteczność w regeneracji uszkodzonej tkanki przez tworzenie „super gradientu” (tak jak w przypadku uszkodzenia mięśnia sercowego – panel B). Poza SDF-1 inne chemoatraktanty również odgrywają ważną rolę w tym procesie (HGF/SF, LIF, VEGF)

FIGURE 4. Concept of the nonhematopoietic stem cells circulation in the peripheral blood. PANEL A – Stem cells can circulate in peripheral blood. At the normal conditions in human organism, a low number of stem cells circulate in the peripheral blood (mostly hematopoietic stem cells). However, the quantity of stem cells increases due to the mobilization mechanisms in situations, such as tissue damage and biological stress processes (acute myocardial infarction, cerebral stroke, liver parenchyma injury, intestine inflammation, etc...). Mobilized stem cells are attracted to the injured tissues due to the concentration gradient of chemotactic agents like SDF-1 (Stromal Derived Factor-1), HGF (Hepatocyte Growth Factor), and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Among stem cell populations mobilized under tissue injury conditions the pluripotent stem cells (such as VSELs) were found. PANEL B – Potential VSELs activity in the myocardial muscle regeneration process. SDF-1 concentration is increased during the acute myocardial infarction. Moreover, activated complement cascade elements ($C3a$ and $C3a_{desArg}$) appear in the heart damaged tissue. These elements modulate and upregulate the response of $CXCR4^+$ stem cells to an increased concentration of SDF-1, what results in a stronger regenerative effect in that tissue by the „super gradient” creation (like in case of the heart hypoxia and damage – panel B). Other chemoattractants play important role in this process as well (HGF/SF, LIF, VEGF)

rozwijającego się w następstwie przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka ze współistniejącym zakażeniem o etiologii *Helicobacter pylori* [38]. W zmienionej śluzówce żołądka zaobserwowano zwiększoną ekspresję SDF-1 (ang. *Stromal Derived Factor-1*), co wskazywać może na potencjalny udział tego chemoatraktanta w mobilizowaniu CXCR4⁺KM ze szpiku kostnego (np. VSELS?). Komórki takie po osiedleniu się w śluzówce żołądka transformowały w komórki inicjujące rozwój gruczolakoraka [61]. Podobne zjawisko, jako mogące wyjaśniać patogenezę rozrostu nowotworowego, wskazano również w niektórych przypadkach raka jelita grubego. Ponadto, z licznych obserwacji wynika, że komórki EPC oraz MSC ze szpiku kostnego mogą być zaangażowane w rozwój nowotworów dostarczając progenitorów komórek naczyń krwionośnych i podścieliska [24, 106]. Na potencjalny udział komórek macierzystych szpiku kostnego w rozwoju guzów litych może wskazywać fakt, że komórki szpikowe eksponowane *in vitro* na rakotwórcze działanie 3-metylocholanotrenu mogą transformować w komórki inicjujące rozrost wielu typów nowotworów [63].

Powyższe dane dostarczają więc dowodów na to, że komórki macierzyste szpiku kostnego mogą być źródłem wielu niehematopoetycznych rozrostów nowotworowych, a sam szpik jest organem „ukrywającym” komórki macierzyste potencjalnie podatne na transformacje nowotworowe. W tym kontekście, dalszych badań wymaga również określenie potencjalnego udziału komórek VSELS w tych niekorzystnych zjawiskach.

PERSPEKTYWY BADAŃ NAD KOMÓRKAMI VSELS

Na podstawie analizy wyników badań własnych, jak również zwiększającej się liczby publikowanych doniesień potwierdzających obecność różnych populacji pierwotnych komórek w szpiku kostnym (m.in. pluripotencjalnych VSELS), uważamy, że „pozytywne” wyniki wcześniejszych badań sugerujące „plastyczność” KKM szpiku kostnego powinny być poddane weryfikacji. Należy odpowiedzieć na pytanie, czy VSELS mogą w organizmie dorosłego osobnika uczestniczyć w odnowie innych, liniowo zdeterminowanych komórek macierzystych, włączając w to np. obecne w szpiku kostnym KKM.

Stosując odpowiednie badawcze modele uszkodzeń narządów u zwierząt, poszukujemy odpowiedzi na pytanie, czy VSELS mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Jak wskazaliśmy wcześniej, VSELS zostały już z powodzeniem zastosowane w eksperymentalnym modelu zawału mięśnia sercowego u myszy [18], ale podstawowym potencjalnym ograniczeniem ich wykorzystania w celach terapeutycznych jest stosunkowo mała liczebność populacji VSELS w szpiku kostnym. Ponadto, jak udokumentowaliśmy, liczba tych komórek maleje z wiekiem [52]. Istnieje również możliwość, że po uszkodzeniu tkanek VSELS zmobilizowane ze szpiku, jeśli nawet docierają bez przeszkód do zmienionego patologicznie narządu, skutecznie uczestniczą w regeneracji jedynie niewielkich uszkodzeń. Pojawia się tym

samym uzasadniona obawa, że efektywna regeneracja większego i bardziej rozległego uszkodzenia tkankowego (np. zawału mięśnia sercowego czy też udaru mózgu) może przekraczać zdolności regeneracyjne tej stosunkowo małolicznej populacji komórek. Dlatego ważne będzie opracowanie protokołów i procedur zapewniających skuteczną ekspansję tych komórek *ex vivo*. Po drugie, migracja i przemieszczenie VSELs do tkanek objętych uszkodzeniem zależy od sygnałów chemotaktycznych, które mogą być niewystarczająco silne i skuteczne. Czynniki chemotaktyczne narażone są bowiem na działanie enzymów proteolitycznych wydzielanych zarówno przez leukocyty krwi obwodowej, jak i makrofagi tkankowe *in situ* w miejscach uszkodzenia. Przykładowo, metaloproteinazy trawiące białka macierzy zewnątrzkomórkowej, wydzielane przez komórki towarzyszące procesom zapalnym powodują m.in. lokalną degradację czynnika chemotaktycznego pochodzenia stromalnego-1, co w efekcie upośledza migrację komórek macierzystych do miejsc uszkodzenia. W takiej sytuacji zmobilizowane VSELs mogą potencjalnie krążyć we krwi obwodowej jako „bezdomna” populacja, a następnie wracać do szpiku kostnego lub zasiedlać inne organy. Po trzecie, aby VSELs mogły w pełni wykazać swój potencjał regeneracyjny, ich czynność musi być w pełni zaktywowana. Badania nasze wskazują, że VSELs rezydujące w szpiku kostnym w wyniku zmian metylacji genów wykazujących piętno genomowe pozostają w stadium „uśpienia”. Jak do tej pory, nie udało się nam jeszcze zidentyfikować kombinacji czynników wzrostowych ani też molekuł adhezyjnych, pozwalających na efektywne namnażanie VSELs *in vitro* bez udziału innych komórek (np. C2C12, OP-9, fibroblastów szpikowych).

PODSUMOWANIE

Wyniki badań uzyskane w naszym laboratorium wskazują, że VSELs mogą stanowić populację komórek alternatywną dla zarodkowych komórek macierzystych. W czasie, kiedy trwa etniczno-religijna debata nad pozyskiwaniem i zastosowaniem komórek embrionalnych w praktyce klinicznej, istnieje uzasadniona potrzeba oceny przydatności VSELs jako alternatywnego źródła PKM w medycynie regeneracyjnej. Musimy więc jak najszybciej znaleźć odpowiedź na pytanie, czy VSELs izolowane z tkanek dorosłych organizmów mogą spełnić te oczekiwania i być efektywnie zastosowane w klinice. Nadchodzące lata przyniosą odpowiedź na to pytanie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALIOTTA JM, SANCHEZ-GUIJO FM, DOONER GJ, 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* 2000; **25**(9): 2245–2256.
- [2] ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; **425**(6961): 968–973.

- [3] 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**(3): 1298–1306.
- [4] ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; **85**(3): 221–228.
- [5] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**(5302): 964–967.
- [6] BALSAM LB, WAGERS AJ, CHRISTENSEN JL, KOFIDIS T, WEISSMAN IL, ROBBINS RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; **428**(6983): 668–673.
- [7] BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**(5497): 1775–1779.
- [8] BUCALA R, SPIEGEL LA, CHESNEY J, HOGAN M, CERAMI A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; **1**(1): 71–81.
- [9] BUNTING KD, HAWLEY RG. Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell* 2003; **95**(9): 563–578.
- [10] CAMPAGNOLI C, ROBERTS IA, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; **98**(8): 2396–2402.
- [11] CASTRO RF, JACKSON KA, GOODELL MA, ROBERTSON CS, LIU H, SHINE HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 2002; **297**(5585): 1299.
- [12] CERADINI DJ, KULKARNI AR, CALLAGHAN MJ et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; **10**(8): 858–864.
- [13] CERNY J, QUESENBERRY PJ. Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol* 2004; **201**(1): 1–16.
- [14] CHERIAN P, HANKEY GJ, EIKELBOOM JW, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* 2003; **34**(9): 2132–2137.
- [15] CORTI S, LOCATELLI F, PAPADIMITRIOU D, STRAZZER S, COMI GP. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. *J Cell Mol Med* 2004; **8**(3): 329–337.
- [16] D'IPPOLITO G, DIABIRA S, HOWARD GA, MENEI P, ROOS BA, SCHILLER PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; **117**(Pt 14): 2971–2981.
- [17] DANNER S, KAJAHN J, GEISMANN C, KLINK E, KRUSE C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2007; **13**(1): 11–20.
- [18] DAWN B, TIVARI S, KUCIA MJ, ZUBA-SURMA EK, GUO Y, SANGALMANATH SK, ABDEL-LATIF A, HUNT G, VINCENT RJ, TAHER H, REED NJ, RATAJCZAK MZ, BOLLI R. Transplantation of Bone Marrow-Derived Very Small Embryonic-like Stem Cells (Vsels) Attenuates Left Ventricular Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction. *Stem Cells* 2008; **26**, 1646–1655.
- [19] DE COPPI P, BARTSCH G, JR., SIDDIQUI MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; **25**(1): 100–106.
- [20] DE FELICIM, MCLAREN A. *In vitro* culture of mouse primordial germ cells. *Exp Cell Res* 1983; **144**(2): 417–427.
- [21] DEVINE SM, FLOMENBERG N, VESOLE DH, et al. Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; **22**(6): 1095–1102.
- [22] DEVINE SM, HOFFMAN R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000; **7**(6): 358–363.
- [23] DEXTER TM, SPOONCER E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* 1987; **3**: 423–441.
- [24] DOME B, TIMAR J, DOBOS J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; **66**(14): 7341–7347.
- [25] DONOVAN PJ. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr Top Dev Biol* 1994; **29**: 189–225.
- [26] DONOVAN PJ. The germ cell-the mother of all stem cells. *Int J Dev Biol* 1998; **42**(7): 1043–1050.

- [27] DYCE PW, ZHU H, CRAIG J, LI J. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**(3): 651–658.
- [28] EGHBALI-FATOURECHI GZ, LAMSAM J, FRASER D, NAGEL D, RIGGS BL, KHOSLA S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005; **352**(19): 1959–1966.
- [29] GUAN K, NAYERIA K, MAIER LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; **440**(7088): 1199–1203.
- [30] HARRIS RG, HERZOG EL, BRUSCIA EM, GROVE JE, VAN ARNAM JS, KRAUSE DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; **305**(5680): 90–93.
- [31] HASEGAWA T, KOSAKI A, SHIMIZU K, et al. Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Neurol* 2006; **199**(2): 274–280.
- [32] HASHIMOTO N, JIN H, LIU T, CHENSUE SW, PHAN SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004; **113**(2): 243–252.
- [33] HILL WD, HESS DC, MARTIN-STUDDARD A et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; **63**(1): 84–96.
- [34] HITCHON C, WONG K, MA G, REED J, LYTTLE D, EL-GABALAWY H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(10): 2587–2597.
- [35] HOLDEN C, VOGEL G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science* 2002; **296**(5576): 2126–2129.
- [36] HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; **7**(5): 393–395.
- [37] HOUCHEM CW, GEORGE RJ, STURMOSKI MA, COHN SM. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* 1999; **276**(1 Pt 1): G249–58.
- [38] HOUGHTON J, STOICOV C, NOMURA S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; **306**(5701): 1568–1571.
- [39] ISHIKAWA F, SHIMAZU H, SHULTZ LD, et al. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *Faseb J* 2006; **20**(7): 950–952.
- [40] JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; **107**(11): 1395–1402.
- [41] JANG YY, SHARKIS SJ. Metamorphosis from bone marrow derived primitive stem cells to functional liver cells. *Cell Cycle* 2004 Aug; **3**(8): 980–982.
- [42] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**(6893): 41–49.
- [43] JIN DK, SHIDO K, KOPP HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4⁺ hemangiocytes. *Nat Med* 2006; **12**(5): 557–567.
- [44] KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, LEE J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; **119**(7): 1001–1012.
- [45] KAWAMOTO A, GWON HC, IWAGURO H, et al. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**(5): 634–637.
- [46] 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**(3-4): 105–116.
- [47] 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**(1): 64–72.
- [48] 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**(1): 265–276.
- [49] KRUSE C, KAJAHN J, PETSCHNIK AE, et al. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate *in vitro* into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 2006; **188**(6): 503–517.
- [50] KUCIA M, DAWN B, HUNT G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; **95**(12): 1191–1199.

- [51] 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**(2): 297–303.
- [52] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL FR, 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**(5): 857–869.
- [53] KUCIA M, RECAR, JALA VR, DAWN B, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005; **19**(7): 1118–1127.
- [54] KUCIA M, WOJAKOWSKI W, RECA R, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp* 2006; **54**(2): 121–135.
- [55] KUCIA M, WU W, RATAJCZAK MZ. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance. *Dev Dyn* 2007; **236**(12): 3309–3320.
- [56] KUCIA M, ZHANG YP, RECA R, et al. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; **20**(1):18–28.
- [57] KUZNETSOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S, SATOMURA K, BIANCO P, ROBEY PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; **153**(5): 1133–1340.
- [58] LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; **6**(11): 1229–1234.
- [59] LEE J, INOUE K, ONO R, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development (Cambridge, England)* 2002; **129**(8): 1807–1817.
- [60] LEMOLI RM, CATANI L, TALARICO S, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 2006; **24**(12): 2817–2825.
- [61] LI HC, STOICOV C, ROGERS AB, HOUGHTON J. Stem cells and cancer: evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. *World J Gastroenterol* 2006; **12**(3): 363–371.
- [62] LING TY, KUO MD, LI CL, 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 USA* 2006; **103**(25): 9530–9535.
- [63] LIU C, CHEN Z, CHEN Z, ZHANG T, LU Y. Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. *Neoplasia* New York, NY 2006; **8**(9): 716–724.
- [64] LIU Y, GAO L, ZUBA-SURMA EK, PENG X, KUCIA M, RATAJCZAK MZ, WANG W, ENZMAN V, KAPLAN HJ, DEAN DC. Identification of small Scf1(+), Lin(-), CD45(-) multipotential cell in the neonatal murine retina. *Exp Hematol* 2009; **37**: 1096–1107.
- [65] LONG MA, CORBEL SY, ROSSI FM. Circulating myogenic progenitors and muscle repair. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**(4–5): 632–640.
- [66] MACCHIARINI P, OSTERTAG H. Uncommon primary mediastinal tumours. *Lancet Oncol* 2004; **5**(2): 107–118.
- [67] MANN JR. Imprinting in the germ line. *Stem Cells* 2001;**19**(4): 287–294.
- [68] MATSUI Y, ZSEBO K, HOGAN BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;**70**(5): 841–847.
- [69] MCLAREN A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003; **262**(1): 1–15.
- [70] MCLAREN A, LAWSON KA. How is the mouse germ-cell lineage established? *Differentiation* 2005 Dec; **73**(9–10): 435–437.
- [71] MENDEZ-FERRERS PS, LULIK A, et al. ES-like cells in the adult murine heart. *Fourth ISSCR Annual Meeting* 2006 [conference proceedings].
- [72] MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; **290**(5497): 1779–1782.
- [73] MIENO S, RAMLAWI B, BOODHWANI M, et al. Role of stromal-derived factor-1alpha in the induction of circulating CD34+CXCR4+ progenitor cells after cardiac surgery. *Circulation* 2006; **114**(1 Suppl): I186–I192.
- [74] MOREL O, TOTI F, HUGEL B, FREYSSINET JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; **11**(3): 156–164.
- [75] MORSHEAD CM, BENVENISTE P, ISCOVE NN, VAN DER KOOY D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 2002; **8**(3): 268–273.

- [76] MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**(6983): 664–668.
- [77] OOSTERHUIS JW, LOOIJENGA LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(3): 210–222.
- [78] ORKIN SH, ZON LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; **3**(4): 323–328.
- [79] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**(6829):701–705.
- [80] PALERMO AT, LABARGE MA, DOYONNAS R, POMERANTZ J, BLAU HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol* 2005; **279**(2): 336–344.
- [81] PALLANTE BA, DUIGNAN I, OKIN D, et al. Bone marrow Oct3/4⁺ cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms. *Circ Res* 2007; **100**(1): e1–11.
- [82] PETIT I, SZYPER-KRAVITZ M, NAGLER A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; **3**(7): 687–694.
- [83] PHILLIPS RJ, BURDICK MD, HONG K, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004 Aug; **114**(3): 438–446.
- [84] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**(5411): 143–147.
- [85] PONOMARYOV T, PELED A, PETIT I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; **106**(11): 1331–1339.
- [86] QUESENBERRY PJ, DOONER G, DOONER M, COLVIN G. The stem cell continuum: considerations on the heterogeneity and plasticity of marrow stem cells. *Stem Cell Rev* 2005; **1**(1): 29–36.
- [87] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**(6): 702–712.
- [88] 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**(5): 847–856.
- [89] RATAJCZAK J, WYSOCZYNSKI M, HAYEK F, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; **20**(9): 1487–1495.
- [90] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**(1): 29–40.
- [91] RATAJCZAK MZ, MACHALINSKI B, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J, KUCIA M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; **21**(5): 860–867.
- [92] RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA EK, MACHALINSKI B, RATAJCZAK J, KUCIA M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization, and biological significance. *Stem Cell Rev* 2008; **4**(2): 89–99.
- [93] RESNICK JL, ORTIZ M, KELLER JR, DONOVAN PJ. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol Reprod* 1998; **59**(5): 1224–1229.
- [94] REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**(6859): 105–111.
- [95] SCHIOPPA T, URANCHIMEG B, SACCANI A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003; **198**(9): 1391–402.
- [96] SELL S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; **51**(1): 1–28.
- [97] SHI Q, RAFII S, WU MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**(2): 362–367.
- [98] SHINTANI S, MUROHARA T, IKEDA H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; **103**(23): 2776–2779.
- [99] SHYU WC, LIN SZ, YANG HI, et al. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 2004; **110**(13): 1847–1854.
- [100] SONG YS, RYU YH, CHOI SR, KIM JC. The involvement of adult stem cells originated from bone marrow in the pathogenesis of pterygia. *Yonsei Med J* 2005; **46**(5): 687–692.

- [101] TACCHINI L, MATTEUCCI E, DE PONTI C, DESIDERIO MA. Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp Cell Res* 2003; **290**(2): 391–401.
- [102] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**(4): 663–676.
- [103] TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; **5**(4): 434–438.
- [104] TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**(6880): 542–545.
- [105] TOGEL F, ISAAC J, HU Z, WEISS K, WESTENFELDER C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int* 2005; **67**(5): 1772–1784.
- [106] TOLAR J, NAUTA AJ, OSBORN MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**(2): 371–379.
- [107] VANWIJK MJ, VANBAVEL E, STURKA, NIEUWLAND R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; **59**: 277–287.
- [108] WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; **297**(5590): 2256–2259.
- [109] WANG X, WILLENBRING H, AKKARI Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; **422**(6934): 897–901.
- [110] WERNIG M, MEISSNER A, FOREMAN R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; **448**(7151): 318–324.
- [111] 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**(20): 3213–3220.
- [112] WU G, MANNAM AP, WU J, et al. Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **285**(6): H2420–429.
- [113] WURMSER AE, NAKASHIMA K, SUMMERS RG, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004; **430**(6997): 350–356.
- [114] YAMAZAKI Y, MANN MR, LEE SS, et al. Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(21): 12207–12212.
- [115] YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; **416**(6880): 545–548.
- [116] ZHANG H, VUTSKITS L, PEPPER MS, KISS JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 2003; **163**(6): 1375–1384.
- [117] ZHAO LR, DUAN WM, REYES M, KEENE CD, VERFAILLIE CM, LOW WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002; **174**(1): 11–20.
- [118] ZWAKA TP, THOMSON JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 2005; **132**(2): 227–233.

Dr Stanisława Walat

Zakład Fizjologii Katedry Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej,

70-111 Szczecin, ul Powst. Wlkp. 72.

e-mail: kzfizjol@sci.pam.szczecin.pl;