

Received: 2010.12.21
Accepted: 2011.01.28
Published: 2011.02.24

Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów

Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool in tissue and organ regeneration

Anna Bajek¹, Joanna Olkowska¹, Tomasz Drewa^{1,2}

¹ Zakład Inżynierii Tkankowej Katedry Biologii Medycznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK Toruń

² Oddział Urologii Onkologicznej, Centrum Onkologii, Bydgoszcz

Streszczenie

Inżynieria tkankowa to dziedzina interdyscyplinarna, której metody stwarzają nowe możliwości regeneracji chorych i uszkodzonych tkanek, wykorzystując przy tym wiele różnych typów komórek, w tym komórki macierzyste. W inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej największym zainteresowaniem cieszą się somatyczne komórki macierzyste, spośród których najczęściej uwagi poświęca się mezenchymalnym komórkom macierzystym – MSC (mesenchymal stem cells) wyizolowanym ze szpiku kostnego. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego są potencjalnym źródłem komórek progenitorowych dla osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, mięśni szkieletowych i kardiomiocytów. Wykazano także, iż komórki te mogą różnicować się w komórki linii ekto- i endodermalnej np. komórki neuronalne, komórki gleju, keratynocyty i hepatocyty. Dostępność autologicznych komórek MSC, ich potencjał proliferacyjny oraz zdolność do wielokierunkowego różnicowania czynią je doskonałym narzędziem inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej. Celem pracy jest przedstawienie charakterystyki i wybranych właściwości biologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego.

Słowa kluczowe:

mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego • inżynieria tkankowa • medycyna regeneracyjna

Summary

Tissue engineering is an interdisciplinary field that offers new opportunities for regeneration of diseased and damaged tissue with the use of many different cell types, including adult stem cells. In tissue engineering and regenerative medicine the most popular are mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow. Bone marrow mesenchymal stem cells are a potential source of progenitor cells for osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, skeletal muscles and cardiomyocytes. It has also been shown that these cells can differentiate into ecto- and endodermal cells, e.g. neuronal cells, glial cells, keratinocytes and hepatocytes. The availability of autologous MSCs, their proliferative potential and multilineage differentiation capacity make them an excellent tool for tissue engineering and regenerative medicine. The aim of this publication is to present characteristic and biological properties of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow.

Key words:

bone marrow mesenchymal stem cells • tissue engineering • regenerative medicine



Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=933878
Word count:	3675
Tables:	2
Figures:	–
References:	86

Adres autorki: dr Anna Bajek, Zakład Inżynierii Tkankowej Katedry Biologii Medycznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: a_bajek@wp.pl

WSTĘP

„Inżynieria tkankowa to interdyscyplinarna dziedzina, która stosuje zasady rządzące inżynierią i hodowlą komórek w celu wytworzenia biologicznych materiałów zastępczych, mogących odbudować, utrzymać lub poprawić funkcję tkanek” [44]. Metody inżynierii tkankowej stwarzają nowe możliwości regeneracji chorych i uszkodzonych tkanek, znajdując tym samym coraz szersze zastosowanie w medycynie. Inżynieria tkankowa zajmuje trzecie miejsce wśród dyscyplin zajmujących się regeneracją tkanek, po transplantacji narządów i chirurgii plastycznej. Przeszczepianie wyhodowanych *in vitro* struktur tkankowopodobnych nie stwarza tytułu problemów klinicznych, ile przeszczepianie narządów pobranych od dawców zmarłych bądź żywych. Nie wymaga stosowania w większości przypadków leków immunosupresyjnych, bowiem przeszczepiona tkanka najczęściej pochodzi z hodowanych komórek autologicznych [74].

W inżynierii tkankowej wykorzystuje się wiele różnych typów komórek, obecnie jednak najczęściej uwagi poświęca się komórkom macierzystym. Komórki macierzyste definiuje się jako nisko zróżnicowane, zdolne do samoodnowy i różnicowania się w jeden lub więcej typów wyspecjalizowanych komórek [66,69]. Klasyfikacja komórek macierzystych opiera się na ich potencjale do różnicowania w inne komórki, tkanki, narządy czy też cały organizm.

Totipotencjalne komórki macierzyste mogą dać początek całemu organizmowi, pluripotencjalne mogą różnicować się w każdy typ komórki; nie są jednak w stanie wytworzyć łożyska i całego organizmu. Multipotencjalne komórki macierzyste to takie, które różnicują się w różne typy komórek, na ogół pochodzące z jednego listka zarodkowego, a unipotencjalne tylko w jeden typ komórki [49].

W inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, interdyscyplinarnej dziedzinie wspomagającej procesy gojenia i naprawy tkanek, największym zainteresowaniem cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste – MSC (mesenchymal stem cells) wyizolowane ze szpiku kostnego [16].

Dostępność autologicznych komórek, potencjał proliferacyjny, zdolność do wielokierunkowego różnicowania i względy etyczne są decydującymi czynnikami odgrywającymi rolę przy wyborze odpowiedniego typu komórek do badań i leczenia.

SZPIK KOSTNY ŹRÓDŁEM KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Źródłem i typów komórek wykorzystywanych do regeneracji tkanek i narządów jest wiele. Są to dojrzałe zróżnicowane komórki, swoiste tkankowo komórki progenitorowe,

w różnym stopniu zróżnicowane komórki macierzyste oraz potencjalnie embrionalne komórki macierzyste i indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste.

Szpic kostny jest heterogennym środowiskiem komórkowym składającym się z hematopoetycznych i niehematopoetycznych komórek macierzystych [69]. Grupa niehematopoetycznych komórek macierzystych jest również heterogenna. Oprócz mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) podejrzewa się istnienie w szpiku kostnym progenitorowych komórek endotelialnych, multipotencjalnych komórek progenitorowych dorosłego organizmu MAPCs (multipotential adult progenitor cells) i bardzo małych embrionalopodobnych komórek macierzystych VSEL (very small embryonic-like stem cells) [63]. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego są potencjalnym źródłem komórek progenitorowych dla osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, mięśni szkieletowych i kardiomiocytów [9,11,12,15,33]. Wykazano także, iż komórki te mogą różnicować się w komórki linii ekto- i endodermalnej np. komórki neuronalne, komórki gleju, keratynocyty i hepatocyty [5,11,18].

Przeszczepy szpiku kostnego są od wielu lat skuteczną metodą leczenia m.in. indukowanej aplazji szpiku po chemioterapii oraz zespołów mielodysplastycznych, a proces izolowania komórek odbywa się bez większych trudności. Dlatego też szpic kostny jest szczególnie dobrym źródłem komórek do potencjalnego stosowania w leczeniu wielu innych chorób [51,77].

IZOLACJA, PROLIFERACJA I MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Obecność niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym została zasugerowana przez niemieckiego patologa Josepha Cohnheima przed 130 laty. Niezbitych dowodów na to, iż szpic kostny zawiera komórki zdolne do różnicowania się w fibroblasty i inne komórki pochodzące ze środkowego listka zarodkowego dostarczyła praca Friedensteina i wsp. [26].

Termin „mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego” (MSC) jest powszechnie używany do opisywania rosnących w warstwie (adherentnych) komórek izolowanych ze szpiku kostnego, które wykazują ekspresję m.in. takich antygenów, jak: CD73, CD90 i CD105 oraz nie wykazują ekspresji antygenów hematopoetycznych. Cechą tych komórek jest zdolność do różnicowania się *in vitro* w osteoblasty, adipocyty i chondrocyty [35,84]. Termin ten został spopularyzowany przez Caplana, który po raz pierwszy opisał izolację mezenchymalnych komórek macierzystych z hodowanej *in vitro* całej frakcji szpiku kostnego [8].

ŹRÓDŁA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH ORAZ METODY ICH IZOLACJI

Mezenchymalne komórki macierzyste izoluje się z podścieliska szpiku kostnego, a ich odsetek stanowi 0,01–0,0001% jednojądrzastych komórek szpiku i zmniejsza się wraz z wiekiem [1,15,18,33]. Największa liczba mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku występuje u noworodków, a u dorosłych powyżej 80 roku życia obniża się o połowę [3,22,81].

Szpik kostny jest najczęściej badany i wykorzystywanym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych, aczkolwiek komórki o podobnej morfologii i charakterystyce wyizolowano również z krwi obwodowej, tkanki tłuszczowej, skóry, kości beczkowatej, krwi płodowej, a także z płuc, wątroby, krwi pępowinowej i łożyska [33,48]. Najlepiej poznany są ludzkie MSC, jednakże komórki te zidentyfikowano również u myszy, świnki morskiej, królika, psa, świni i szczura [84]. Opracowano wiele metod izolacji, jednak najczęściej wykorzystuje się właściwości adherentne komórek macierzystych szpiku w odróżnieniu od komórek hematopoetycznych, które usuwane są wraz z kolejnymi zmianami pożywki hodowlanej. Komórki, które ulegają adhezji do powierzchni naczynia hodowlanego wykazują fibroblastopodobną morfologię i rozwijają się w symetryczne kolonie.

CHARAKTERYSTYKA WZROSTU MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Początkowe zagęszczenie hodowli ma duży wpływ nie tylko na wzrost MSC, ale także na ich morfologię [78]. Wzrost mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro* charakteryzuje się na podstawie występowania trzech faz: fazy początkowej (lag), która trwa 3–4 dni, fazy gwałtownego wzrostu (log) i fazy stałego wzrostu (plateau) [6,14]. Mezenchymalne komórki macierzyste *in vitro* mogą być pasażowane ograniczoną liczbę razy (około 8–15 pasaży), co odpowiada 25–40-krotnym podwojeniu populacji, po czym starzeją się i przestają proliferować [84]. Uważa się, że ograniczona długość życia mezenchymalnych komórek macierzystych w hodowli *in vitro* wynika, podobnie jak w przypadku komórek zróżnicowanych, z braku aktywności telomerazy [80]. Manipulacje genetyczne pozwalające na zachowanie długoterminowej hodowli komórek MSC polegają na wprowadzeniu genu odwrotnej transkryptazy i uzyskaniu reekspresji ludzkiej telomerazy (hTERT). Podkreślić należy jednak, że długoterminowa hodowla nieśmiertelnych mezenchymalnych komórek macierzystych może prowadzić do nowotworzenia. Odkrycie macierzystych komórek nowotworowych pozwala sądzić, iż geny powstawania nowotworów może być niekontrolowana proliferacja komórek macierzystych w zróżnicowanych tkankach [10,69,76].

Jednak badania cyklu komórkowego MSC wskazują, iż powyżej około 10% populacji komórek znajduje się w fazie S, G2 i M, a ogromna większość pozostaje w fazie G0/G1 cyklu komórkowego [13]. Prawidłowy kariotyp komórek macierzystych jest stabilny nawet po 12 pasażu [58].

PODZIAŁY KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Komórki macierzyste podlegają podziałom symetrycznym i asymetrycznym. Podział symetryczny prowadzi

do powstania dwóch identycznych komórek potomnych. Powstałe komórki mogą pozostać komórkami macierzystymi, albo przekształcając się w komórki różnicujące się, co zmniejsza pulę komórek macierzystych o określonym stopniu zróżnicowania. Powszechnie przyjętą teorią jest teoria podziałów asymetrycznych, które umożliwiają zachowanie stałej liczby komórek macierzystych. Po podziale jedna z komórek potomnych pozostaje w niszy komórek macierzystych, a druga ulega różnicowaniu [52]. Inną teorią podziału komórek macierzystych zaproponowaną ponad 50 lat temu jest selekcja klonalna, która zakłada stałe uwalnianie komórek macierzystych, które następnie ulegają podziałom symetrycznym i różnicowaniu się [36].

FENOTYP MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Ekspresja genów w wyizolowanych ze szpiku kostnego mezenchymalnych komórkach macierzystych oraz fenotyp tych komórek zmienia się w trakcie trwania hodowli w warunkach *in vitro*. Dotąd nie zidentyfikowano uniwersalnego i swoistego antygenu charakterystycznego dla mezenchymalnych komórek macierzystych. Dlatego też fenotyp komórek opisywany jest na podstawie ekspresji wielu markerów powierzchniowych. Komórki mezenchymalne nie mają na swojej powierzchni hematopoetycznych i endotelialnych markerów, takich jak CD11b, CD14, CD31, CD 34, CD45 [1,84]. Są charakteryzowane jako niehematopoetyczne, które mogą być identyfikowane przez następujące antygeny: CD44, SH-4 (CD73), CD90, SH-2 (CD105), CD117 (c-kit), SH-3 (CD166) i STRO-1 [1,84]. Molekularną charakterystykę mezenchymalnych komórek macierzystych przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki wielu doświadczeń wskazują na konieczność stosowania kombinacji kilku markerów w celu izolacji czystej populacji multipotencjalnych MSC. Proponuje się zastosowanie zestawu następujących znaczników: CD105 i CD73, CD166 i CD105 oraz STRO-1, Thy-1, CD49, CD10 i CD146 [3]. Ekspresja niektórych markerów może się zmieniać w warunkach hodowli *in vitro*, w odpowiedzi na różne warunki hodowli, w tym liczbę pasaży. Przykładem antygenu, który jest nieobecny na MSC uzyskanych z hodowli *in vitro*, ale który ulega ekspresji na płodowych MSC pochodzących z płuc, jest CD34 [3,17,81]. Wskazuje to możliwość zmiany ekspresji różnych antygenów w czasie dojrzewania mezenchymalnych komórek macierzystych, co dodatkowo utrudnia ich identyfikację i utrzymanie jednorodnych hodowli.

BIOLOGICZNE FUNKCJE ORAZ NISZA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Wśród wielu biologicznych funkcji mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego na uwagę zasługuje immunomodulujący mechanizm działania tych komórek. Są one zdolne do hamowania proliferacji limfocytów cytotoksycznych oraz komórek NK [11,56]. MSC wykazują ekspresję MHC I klasy, nie wykazują ekspresji MHC II klasy, a także nie mają receptorów kostymulujących CD80 i CD86, niemogąc tym samym pełnić funkcji komórek prezentujących antygen [3,5,9,22,34]. Dokładny mechanizm leżący u podstaw modulowania odpowiedzi immunologicznej przez MSC nie został dostatecznie wyjaśniony.

Niewiele wiadomo również o umiejscowieniu i naturze niezróżnicowanych multipotencjalnych mezenchymalnych



Tabela 1. Wybrane cechy mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego: ekspresja antygenów, receptorów cytokin, cząsteczek adhezyjnych, produkty cytokin i cząsteczek macierzy [50,60,73]

Typ znacznika	Oznaczone antygeny, receptory, cząsteczki adhezyjne, produkty cytokin i cząsteczki macierzy
Swoiste antygeny	SH2 (CD105), SH3/SH4 (CD73), STRO-1, α -aktyna mięśni gładkich, Thy-1 (CD90), CD34 (tylko w świeżym szpiku), Sca-1
Cytokiny i czynniki wzrostu stymulujące wzrost komórek MSC	interleukiny: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 i 15 LIF (leukemia inhibitory factor), SCF (stem cell factor), GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), M-CSF (macrophage colony stimulating factor)
Receptory cytokin i czynników wzrostu	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR (CD118), SCFR (CD117), G-CSFR (CD114), IFN- γ R (interferon γ receptor), TGF- β IR (transforming growth factor β I receptor), bFGFR (basic fibroblast growth factor receptor), PDGFR (platelet derived growth factor receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor)
Cząsteczki adhezyjne	integryny: av β 3, av β 5 ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106), ALCAM-1 (CD166), L-selektyna, CD44

komórek macierzystych. Komórki te identyfikuje się w wielu tkankach w specjalnych przestrzeniach zwanych „niszami komórek macierzystych”, które stanowią ich rezerwuar. Komórki macierzyste pozostają nieaktywne mitotycznie, zdolne do proliferacji pod wpływem urazu, choroby czy skutków starzenia [58]. Ulegają także cyklicznym podziałom w warunkach fizjologicznych. Hipotezę o istnieniu niszy komórek macierzystych szpiku kostnego po raz pierwszy zaproponował Shofield [71]. Badania anatomicznego rozmieszczenia MSC wewnątrz szpiku kostnego dowiodły, iż komórki są umiejscowione w bliskim sąsiedztwie śródkostnej [3]. Nie wyjaśniono także w jaki sposób mezenchymalne komórki macierzyste pozostają w stanie nieodróżnicowanym. Wiele wyników badań wskazuje na to, że m.in. szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina decyduje o tym, czy komórki pozostaną nieodróżnicowane, czy zaczną się różnicować [67].

PLASTYCZNOŚĆ KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Jednym z najbardziej kontrowersyjnych a zarazem niezwykle ciekawych zagadnień jest plastyczność komórek macierzystych [39]. Dyskusja nad pojęciem plastyczności ma długą historię, zwłaszcza w biologii ewolucyjnej. Odkrycie, iż komórki macierzyste mogą różnicować się zarówno w komórki charakterystyczne dla tkanki, w obrębie której się znajdują, jak i w inne rodzaje komórek, zrodziło potrzebę wyjaśnienia tych zjawisk [53]. Plastyczność jest to zdolność komórek macierzystych do przekroczenia bariery jej pochodzenia z określonego listka zarodkowego i przyjęcie fenotypu komórki innej tkanki lub innego listka zarodkowego. Innymi słowy plastyczność można określić jako niestabilność fenotypową komórki [85]. W takim ujęciu definicja plastyczności obejmuje prawdopodobnie takie procesy jak odróżnicowanie (dedyferencjacje), przeróżnicowanie (transdyferencjacje), fuzję komórek, metaplastyzę oraz wędrówkę komórek pluripotencjalnych [21,70,72,75]. Z powodu braku ściśle zdefiniowanych markerów swoistych dla danego typu komórki czy stopnia jej różnicowania, nie

udowodniono, które z wyżej wymienionych zjawisk wyjaśnia pojęcie plastyczności i czy wszystkie one składają się na zjawisko plastyczności.

Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego ulegają typowemu różnicowaniu w komórki pochodzenia mezodermalnego: osteocyty, adipocyty i chondrocyty oraz komórki mięśniowe [12,22,47,64]. Wykazano również, iż mogą różnicować się *in vitro* w kardiomiocyty, a także w komórki linii niemezodermalnej, takie jak hepatocyty, komórki wytwarzające insulinę, keratynocyty, komórki nabłonka jelitowego i neurony [45,51]. Mechanizmy prowadzące do tak szerokich możliwości różnicowania się MSC są słabo poznane i dlatego obserwacje te są źródłem wielu kontrowersji.

Transdyferencjacja jest powszechnie używanym terminem opisującym zmiany fenotypowe komórek. Często obserwowanym w klinice obrazem transdyferencjacji jest metaplastyzja [7]. Metaplastyzja oznacza zmianę jednego typu komórki (bądź tkanki) w inny [24]. Opierając się na takiej definicji metaplastyzji, a tym samym i transdyferencjacji, można zaryzykować stwierdzenie, iż komórka macierzysta danej tkanki może się przekształcić w tej tkance w różne inne typy komórek. Transdyferencjacja i metaplastyzja związane są ze zmianą profilu ekspresji genów, a co za tym idzie, ze zmianami morfologicznymi i czynnościowymi komórek [24]. Na poziomie molekularnym wynika to najprawdopodobniej ze zmiany ekspresji głównych genów (tzw. „master switch genes”), które kontrolują różnicowanie komórek w czasie procesów rozwojowych [70]. Jednym z pierwszych, który określił pojęcie transdyferencjacji był Okada, który zdefiniował je jako przeprogramowanie komórki różnicowanej w inną komórkę zróżnicowaną pochodzącą z odmiennego listka zarodkowego [54]. Nie wiadomo, czy transdyferencjacja dotyczy tak wąskiej grupy zjawisk, czy też można ją rozszerzyć do przeprogramowania w obrębie jednego listka zarodkowego. Obecnie uważa się, iż termin ten jest bardziej ogólny i dotyczy również plastyczności komórek

macierzystych. Opisuje on przemianę jednego typu komórki w inną, włączając wewnętrzne procesy przebiegające między komórkami macierzystymi [24,70]. Koncepcja ta zmienia powszechne myślenie, iż ostatecznie zróżnicowana komórka nie podlega zmianom fenotypu.

Procesy prowadzące komórkę do przeróżnicowania nie zostały dostatecznie opisane. Nie wiadomo, czy do przeróżnicowania konieczne jest wcześniejsze odróżnicowanie komórki polegające na zmianie fenotypu, struktury cytoskieletu oraz wyciszeniu ekspresji określonych genów [2,72]. Stosunkowo łatwo można zaobserwować zmiany fenotypu, przebiegające podczas transdyferencji, w porównaniu do zmian zachodzących w obrębie chromatyny. Przeróżnicowanie zachodzi często częściowo lub niekompletnie prowadząc do mieszanego fenotypu [2]. Poznanie związku między wpływem czynników zewnętrznych na funkcję genów a ich ekspresją pozwoli być może na precyzyjne regulowanie procesu transdyferencji.

Transdyferencję trudno obserwować w warunkach *in vitro*, co wynika z trudności udowodnienia tego zjawiska dostępnymi metodami analiz morfologii komórek oraz ich fenotypu [65]. Badania w warunkach *in vivo* dowodzą jednak, iż możliwe jest eksperymentalne zainicjowanie przeróżnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki nerwowe lub w hepatocyty [2,38]. Najbardziej znanym przykładem transdyferencji jest zmiana fenotypu komórek mięśni gładkich w komórki mięśni szkieletowych podczas rozwoju przełyku oraz zmiana fenotypu komórek siatkówki w komórki epitelialne soczewki po urazie oka u trzaski [21].

Plastyczność komórek macierzystych można również tłumaczyć hipotezą mówiącą o niejednorodności populacji komórek macierzystych uzyskanych do badań [19]. Wśród unipotencjalnych komórek macierzystych regenerujących dany narząd mogą potencjalnie znajdować się także inne populacje komórek macierzystych będące na różnym stopniu zróżnicowania [62,84]. Uważa się, że są to rzadkie populacje komórek, zarówno multipotencjalnych, jak i pluripotencjalnych [61]. Prawdopodobnie komórki te „zanieczyszczają” hodowlę mezenchymalnych komórek macierzystych i to one podlegają różnicowaniu w komórki innych listków zarodkowych [40]. Kilka lat temu zespół prof. M. Ratajczaka zidentyfikował w szpiku kostnym, śledzionie i grasicy komórki pluripotencjalne (nazwane przez nich bardzo małymi embrionalnopodobnymi – VSEL), które wykazują podobne cechy do komórek linii zarodkowej [43]. Komórki wykazujące ekspresję markerów charakterystycznych dla embrionalnych komórek macierzystych opisano także w innych niehematopoetycznych narządach i tkankach, takich jak skóra, mięsień sercowy, trzustka, jądra, siatkówka oraz płyn owodniowy [42].

Nie udało się jeszcze udowodnić istnienia komórek pluripotencjalnych w każdej tkance organizmu w związku z tym wskazuje się możliwość wędrówki tychże komórek do miejsc docelowych, tj. do uszkodzonych tkanek czy narządów. Hipotezę tę potwierdza również trudność w zdefiniowaniu niszy komórek macierzystych w obrębie każdej tkanki. Sugeruje się, że komórki pluripotencjalne znajdują się m.in. w szpiku kostnym, a pod wpływem uszkodzenia tkanki i/lub narządu zaczynają migrować stając się

jednocześnie źródłem komórek macierzystych potrzebnych do regeneracji [43]. Dowodów dostarczają badania wskazujące na przenikanie komórek macierzystych szpiku kostnego do krwi obwodowej w odpowiedzi na uszkodzenie narządów czy podanie odpowiednich cytokin przed pobraniem komórek macierzystych do przeszczepienia [40,45,63,86]. Uszkodzone narządy wydzielają różne czynniki np. FGF-2, VEGF, które działają chemotaktycznie na komórki pluripotencjalne [41]. Według tej koncepcji komórki macierzyste wędrują do miejsca uszkodzenia. Najprawdopodobniej dzieje się to za przyczyną chemokin i ich receptorów, które są ważnymi czynnikami kontrolującymi migrację komórek [9,45]. Liczba niehematopoetycznych pluripotencjalnych komórek macierzystych w krwi obwodowej rośnie po zawale serca i udarze mózgu, a także w czasie uszkodzenia mięśni szkieletowych, nerek, wątroby oraz urazów kostnych [30,86]. Potwierdzono hipotezę o zwiększonej liczbie krążących komórek macierzystych u pacjentów, którym przeszczepiono wątrobę, nerki, serce lub płuca [21]. W stanie równowagi dynamicznej niewiele wielopotencjalnych komórek macierzystych krąży między szpikiem kostnym a tkankami obwodowymi [41]. Kolonizacja przez pluripotencjalne komórki macierzyste szpiku kostnego w czasie rozwoju może być realnym wytłumaczeniem plastyczności komórek macierzystych i tłumaczyć ich wszechobecność w tkankach dorosłego organizmu [43].

Badanie wędrówki komórek macierzystych w organizmie jest niestety utrudnione brakiem dostatecznie czułej metody umożliwiającej przyżyciową detekcję przeszczepionych komórek macierzystych, co nie dostarcza dowodów potwierdzających tezę o komórkach macierzystych i ich udziale w zjawisku plastyczności.

Kolejną proponowaną koncepcją tłumaczącą plastyczność komórek macierzystych jest fuzja komórek. Fuzja komórek naturalnie występuje w organizmach wielokomórkowych, obserwowana jest również w warunkach chorobowych, indukowanych m.in. zakażeniem bakteryjnym [46]. Fuzja komórek może być również indukowana w warunkach *in vitro*. Wyniki opublikowane przez grupy niezależnych badaczy wskazują, iż hematopoetyczne komórki macierzyste lub monocyty dawcy mogą się łączyć ze zróżnicowanymi komórkami w tkankach biorcy. Prowadzi to do powstania komórek tetraploidalnych, które wykazują ekspresję markerów powierzchniowych i cytoplazmatycznych charakterystycznych dla obu komórek rodzicielskich [43,79]. Wyniki badań hodowli łączonych (co-cultures) embrionalnych komórek macierzystych z neuronalnymi komórkami macierzystymi lub szpiku kostnego ujawniły spontaniczne powstawanie pluripotencjalnych komórek hybrydowych, aczkolwiek częstość tego zjawiska jest niezwykle niska (1:10000–1:100000 neuronalnych komórek macierzystych oraz 1:100000–1000000 komórek szpiku kostnego) [20,27]. Niemniej jednak podkreśla to możliwość uzyskania przez komórki macierzyste dorosłego organizmu większego potencjału do różnicowania w wyniku fuzji z komórkami słabiej zróżnicowanymi.

Wyniki badań nad fuzją komórek są sprzeczne. Hematopoetyczne komórki macierzyste są liczne w krwi pępowinowej i obwodowej, więc jeśli zjawisko fuzji byłoby powszechne, wiele narządów zawierałoby komórki poli-ploidalne, co poza mięśniami szkieletowymi i wątrobą nie



Tabela 2. Wybrane czynniki regulujące różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych

Biologiczne i chemiczne czynniki różnicujące	Kierunek różnicowania
TGF- β	chondrocyty, miocyty gładkie
IGF-1	chondrocyty
bFGF	chondrocyty, osteoblasty, neurony
EGF	chondrocyty
PDGF	chondrocyty, miofibroblasty, miocyty gładkie
VEGF	komórki endotelialne
BMP-12	cenocyty
Deksametazon+izobutylometyloksantyna+indometacyna+insulina	adipocyty
Kwas askorbinowy	chondrocyty
β -glicerofosforan	osteoblasty
5'azacytydyna	kardiomiocyty
Kwas linolowy	oligodendrocyty, neurony
DMSO+deksametazon	astrocyty

zostało udokumentowane [59]. Zjawiska fuzji nie obserwuje się również po przeszczepieniu szpiku kostnego [32]. Sugeruje się, że fuzja może być spowodowana złymi warunkami hodowli komórek i ekspozycją ich na działanie różnych czynników selekcyjnych [4,23]. Inni uważają, że fuzja możliwa jest tylko między komórkami, które naturalnie występują w postaci komórczaków [68]. Komórki powstałe w wyniku fuzji wykazują mniejszą stabilność genetyczną oraz wolny cykl komórkowy. Fuzja może również prowadzić do nowotworzenia [79,82]. Fuzja komórek wydaje się niezwykle rzadkim zjawiskiem, zwłaszcza *in vivo* i niewystarczającym wyjaśnieniem plastyczności komórek [27,31].

KIERUNKI I KONTROLA RÓZNICOWANIA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH SZPIKU KOSTNEGO

Różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro* w określonym kierunku wymaga zastosowania swoistych czynników wzrostu lub związków chemicznych o właściwościach różnicujących. Wybrane czynniki determinujące różnicowanie MSC przedstawiono w tabeli 2.

Czynniki wzrostu, które modulują różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych, to m.in. rodzina czynników TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3), a także białka morfogenetyczne kości (BMP). W badaniach nad ludzkimi MSC stwierdzono, że TGF- β 2 i TGF- β 3 są bardziej aktywne niż TGF- β 1. Po stymulacji TGF- β 2 i TGF- β 3 obserwowano wzmoczoną syntezę proteoglikanów i kolagenu typu II. Białko morfogenetyczne kości 2, 4 i 6 uczestniczy w różnicowaniu MSC w kierunku tkanki chrzęstnej [45].

Oprócz swoistych czynników wzrostu w różnicowaniu odgrywają również rolę inne czynniki, takie jak deksametazon, insulina, indometacyna, 5'azacytydyna. MSC hodowane

w obecności 5'azacytydyny różnicują się w mioblasty, które łącząc się dają początek kurczącym się rytmicznie miotubulom [9,12,33,45]. Suplementacja środowiska hodowli nikotynoamidem i β -merkaptotanołem indukuje różnicowanie się szczurzych mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki podobne do komórek β wysepek trzustkowych, natomiast dodatek DMSO powoduje powstawanie komórek neuronopodobnych [33,45,57].

Różnicowanie komórek w warunkach *in vitro* jest ograniczone wieloma czynnikami. Nie udowodniono, iż różnicowanie w warunkach *in vitro* odzwierciedla ten sam proces w warunkach *in vivo*. Wydaje się, iż ścieżka przekazywania sygnału kontrolującego różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych jest bardziej złożona w warunkach *in vivo* [28]. Niemniej jednak hodowla komórek *in vitro* daje ogromne możliwości badania potencjału mezenchymalnych komórek macierzystych.

Zdolność komórek macierzystych do przekształcania się w wiele rodzajów komórek budujących organizm jest ich unikatową cechą. Znajomość czynników nadających komórkom macierzystym taki potencjał do różnicowania jest bardzo ważna.

Szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina zapewnia komórkom macierzystym zdolność do samoodnawiania populacji i utrzymuje je w stanie nieodróżnionym. Białka z rodziny Wnt odgrywają główną rolę w regulowaniu cyklu życiowego komórek. Uczestniczą w kontrolowaniu proliferacji komórek, ich różnicowaniu i apoptozie [37]. Białka Wnt są rodziną białek konserwatywnych działających w mechanizmie auto- i parakrynnym. Ich biologiczna funkcja wywołana jest poprzez związanie się z receptorem znajdującym się na powierzchni komórek sąsiednich, wchodzących w skład niszy komórek macierzystych. Fibroblasty, komórki endotelialne i otaczające mikrośrodowisko wpływają na

funkcję komórek macierzystych [49]. Receptorami białek Wnt są białka z rodziny Frizzled [64]. Związanie białek Wnt z receptorem Frizzled powoduje aktywację białek z rodziny Dsh (Dishevelled) zapobiegając tym samym degradacji cytoplazmatycznej β -kateniny. W wyniku tej aktywacji β -katenina jest stabilizowana i kierowana do jądra komórkowego, gdzie współdziałając z czynnikami transkrypcyjnymi indukuje transkrypcję genów docelowych [37]. Obecnie znanych jest ponad 100 genów kontrolowanych przez szlak Wnt/ β -katenina [64]. Wywoływanie odpowiedzi biologicznej poprzez aktywację podstawowego szlaku Wnt zależy od stanu komórek macierzystych oraz od ich środowiska, które może wpływać na aktywację białek Wnt w czasie rozwoju komórek. Nadekspresja β -kateniny *in vivo* lub dodanie rozpuszczalnej postaci Wnt 3 do hodowli *in vitro* pobudza zdolność samoodnawiania hematopoetycznych komórek macierzystych [52]. Funkcja białek Wnt w rozwoju komórek macierzystych oraz hamowanie ich różnicowania jest najprawdopodobniej mechanizmem deregulacji ścieżki sygnałowej Wnt, co może indukować procesy nowotworzenia [37].

W kontroli różnicowania komórek macierzystych, oprócz szlaku Wnt/ β -katenina, istotną rolę odgrywają także szlaki sygnałowe Notch i Hedgehog.

Szlak sygnalizacyjny Notch jest uniwersalnym mechanizmem regulacji aktywności genów, odpowiedzialnych za kontrolę zarówno proliferacji komórek, jak i ich różnicowania [25]. Białka Notch należą do rodziny białek śródbłonowych. Ligandy receptora Notch są również białkami integralnymi błony [25]. U ssaków występują cztery geny kodujące receptor (Notch1-Notch4) oraz pięć ligandów. Ekspresja receptorów Notch zachodzi w wielu typach komórek, a zakres regulowanych procesów rozwojowych jest bardzo szeroki. Białka Notch spełniają jednocześnie funkcję receptora i czynnika transkrypcyjnego [25]. Aktywacja białek Notch jest niezbędna do utrzymania zdolności komórek macierzystych do ich samoodnawiania i do zablokowania wejścia komórek na drogę różnicowania [52]. Jednak wiele zróżnicowanych linii komórkowych wymaga obecności aktywnego receptora Notch, co sugeruje konieczny udział tego białka w zachowaniu odpowiedniego kierunku różnicowania [64]. Szlak aktywacji białek Notch jest dobrze poznany, aczkolwiek mechanizmy regulujące ten proces, czy docelowa grupa genów regulowanych przez receptor Notch nie zostały jeszcze dostatecznie dokładnie opisane [25].

Szlak sygnalizacyjny aktywowany przez białko Shh (Sonic hedgehog homolog) jest podstawowym mechanizmem regulującym rozwój embrionalny ssaków [83]. Białka Hedgehog zaangażowane są w proliferację komórek oraz

ich różnicowanie, zwłaszcza mezenchymalnych komórek macierzystych i neuronalnych [52]. Receptorami Shh są białka błonowe należące do rodziny Ptc (Patched). U ssaków zaangażowane w różnicowanie komórek macierzystych są dwie postaci receptora: receptor Ptc1 i Ptc2 [83].

Za kontrolę proliferacji i różnicowania komórek macierzystych niezwiązaną z aktywacją receptorów odpowiedzialne są czynniki transkrypcyjne m.in. białko Oct4 i Nanog. Białko Oct4 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za proliferację komórek i utrzymanie ich w stanie niezróżnicowanym [55]. W hodowli *in vitro* obecność białka Oct4 stwierdza się tylko w komórkach o charakterze pluripotencjalnym, natomiast *in vivo* tylko w komórkach wężła zarodkowego blastocysty [52]. Białko Nanog uważane jest za główny czynnik regulujący samoodnawianie embrionalnych komórek macierzystych, utrzymuje ono ich pluripotencjalny charakter [52]. Nadekspresja białka Nanog w komórkach embrionalnych zwiększa ich aktywność proliferacyjną i utrzymuje w stanie niezróżnicowanym [29,52,55].

Molekularne mechanizmy leżące u podstaw różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych w większości pozostają nieznane. Niewiele również wiadomo o różnicowaniu się komórek w warunkach *in vivo*, gdyż większość używanych *in vitro* czynników nie występuje w organizmie człowieka i zwierząt. Wyjaśnienie kaskady molekularnych przemian, białek kodowanych przez określone geny, a także powiązań między tymi białkami pozostaje nadrzędnym zadaniem do stworzenia lepszych możliwości leczenia wielu chorób.

PODSUMOWANIE

Jednym z najbardziej obiecujących kierunków badań w naukach medycznych jest medycyna regeneracyjna, której głównymi narzędziami są izolowane komórki i specjalnie zaprojektowane biomateriały. Dyskusje ostatnich lat dotyczą rozstrzygnięcia, który typ komórek, macierzystych czy zróżnicowanych, będzie najbardziej użyteczny w leczeniu wielu chorób. Nie ma jednoznacznej odpowiedzi, oczywiście jest, że różne typy komórek będą pełniły różną rolę w zależności od zadań, które mają spełniać. Komórki szpiku kostnego szybciej niż inne typy komórek zostały wprowadzone do praktyki klinicznej. Możliwość różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego w wiele typów komórek sprawia, iż ich wykorzystanie rozważane jest jako atrakcyjne źródło komórek do regeneracji tkanek i narządów. Wyzwaniem jednak wciąż pozostaje efektywne różnicowanie komórek MSC w kierunku pożądanego typu komórek i utrzymanie fenotypu komórek uprzednio zróżnicowanych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdallah B., Kassem M.: The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J. Cell Physiol.*, 2009; 218: 9–12
- [2] Batts S.A., Raphael Y.: Transdifferentiation and its applicability for inner ear therapy. *Hear. Res.*, 2007; 227: 41–47
- [3] Bobis S., Jarocha D., Majka M.: Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2006; 44: 215–230
- [4] Brittan M., Braun K.M., Reynolds L.E., Conti F.J., Reynolds A.R., Poulson R., Alison M.R., Wright N.A., Hodivala-Dilke K.M.: Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate *in vivo* with no evidence of cell fusion. *J. Pathol.*, 2005; 205: 1–13
- [5] Brooke G., Cook M., Blair C., Han R., Heazlewood C., Jones B., Kambouris M., Kollar K., McTaggart S., Pelekanos R., Rice A., Rossetti T., Atkinson K.: Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2007; 18: 846–858



- [6] Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.*, 1997; 64: 278–294
- [7] Burke Z.D., Tosh D.: Therapeutic potential of transdifferentiated cells. *Clin. Sci.*, 2005; 108: 309–321
- [8] Caplan A.I.: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 1991; 9: 641–650
- [9] Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J.: Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007; 25: 2739–2749
- [10] Chambers S.M., Goodell M.A.: Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. *Stem Cell Rev.*, 2007; 3: 201–211
- [11] Chen Y., Shao J.Z., Xiang L.X., Dong X.J., Zhang G.R.: Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008; 40: 815–820
- [12] Chiu R.C.: Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail. Rev.*, 2003; 8: 247–251
- [13] Conget P.A., Minguell J.J.: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.*, 1999; 181: 67–73
- [14] Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J.: Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 7841–7845
- [15] Croft A.P., Przyborski S.A.: Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma: basic biology and potential for cell therapy. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, 2004; 15: 410–417
- [16] Dai W., Hale S.L., Kloner R.A.: Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction. *Transpl. Immunol.*, 2005; 15: 91–97
- [17] Deans R.J., Moseley A.B.: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.*, 2000; 28: 875–884
- [18] Dominici M., Hofmann T.J., Horwitz E.M.: Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2001; 15: 28–37
- [19] Drewa T., Joachimiak R., Kaznica A., Sarafian V., Sir J.: Primary cultures from rat vibrissae as a potential cell source for in vitro construction of urinary bladder wall grafts. *Transplant. Proc.*, 2009; 41: 1932–1935
- [20] Eisenberg L.M., Eisenberg C.A.: Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 2003; 69: 209–218
- [21] Fang T.C., Alison M.R., Wright N.A., Poulosom R.: Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int. J. Exp. Pathol.*, 2004; 85: 115–124
- [22] Fibbe W.E.: Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002; 61(Suppl.2): ii29–ii31
- [23] Filip S., Mokry J., English D., Vojáček J.: Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biol.*, 2005; 51: 180–187
- [24] Filip S., Mokry J., Horacek J., English D.: Stem cells and the phenomena of plasticity and diversity: a limiting property of carcinogenesis. *Stem Cells Dev.*, 2008; 17: 1031–1038
- [25] Fiúza U.M., Arias A.M.: Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.*, 2007; 194: 459–474
- [26] Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luriá E.A., Rudakov I.A.: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.*, 1974; 2: 83–92
- [27] Frisén J.: Stem cell plasticity? *Neuron*, 2002; 35: 415–418
- [28] Gimble J.M., Guilak F., Nuttall M.E., Sathishkumar S., Vidal M., Bunnell B.A.: In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus. Med. Hemother.*, 2008; 35: 228–238
- [29] Gokhale P.J., Andrews P.W.: New insights into the control of stem cell pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008; 2: 4–5
- [30] Gomperts B.N., Belperio J.A., Rao P.N., Randell S.H., Fishbein M.C., Burdick M.P., Strieter R.M.: Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J. Immunol.*, 2006; 176: 1916–1927
- [31] Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnam J.S., Krause D.S.: Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 2004; 305: 90–93
- [32] Horwitz E.M.: Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch. Med. Res.*, 2003; 34: 600–606
- [33] Jackson L., Jones D.R., Scotting P., Sottile V.: Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med.*, 2007; 53: 121–127
- [34] Javazon E.H., Beggs K.J., Flake A.W.: Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.*, 2004; 32: 414–425
- [35] Karp J.M., Leng Teo G.S.: Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 2009; 4: 206–216
- [36] Kay H.E.: How many cell-generations? *Lancet*, 1965; 2: 418–419
- [37] Kléber M., Sommer L.: Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 681–687
- [38] Krabbe C., Zimmer J., Meyer M.: Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells—a critical review. *APMIS*, 2005; 113: 831–844
- [39] Kucia M., Majka M., Ratajczak M.Z.: Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych: fakt czy artefakt? *Postępy Biol. Kom.*, 2003; 30(Supl.21): 3–16
- [40] Kucia M., Reza R., Jala V.R., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia*, 2005; 19: 1118–1127
- [41] Kucia M., Wu W., Ratajczak M.Z.: Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance. *Dev. Dyn.*, 2007; 236: 3309–3320
- [42] Kucia M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, 2008; 26: 2083–2092
- [43] Kucia M., Zuba-Surma E., Wysoczynski M., Dobrowolska H., Reza R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006; 57(Suppl.5): 5–18
- [44] Langer R., Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science*, 1993; 260: 920–926
- [45] Liu Z.J., Zhuge Y., Velazquez O.C.: Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 106: 984–991
- [46] Lucas J.J., Terada N.: Cell fusion and plasticity. *Cytotechnology*, 2003; 41: 103–109
- [47] Martin D.R., Cox N.R., Hathcock T.L., Niemeyer G.P., Baker H.J.: Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 879–886
- [48] Menicanin D., Bartold P.M., Zannettino A.C., Gronthos S.: Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.*, 2009; 5: 36–50
- [49] Mimeault M., Batra S.K.: Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev.*, 2008; 4: 27–49
- [50] Minguell J.J., Erices A., Conget P.: Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 2001; 226: 507–520
- [51] Miyazaki M., Kataoka K., Medina R.J., Kageyama T., Huh N.: Differentiation of bone marrow cells in culture and in vivo. *Int. Congr. Ser.*, 2003; 1252: 461–464
- [52] Molofsky A.V., Pardoll R., Morrison S.J.: Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 700–707
- [53] Morange M.: How phenotypic plasticity made its way into molecular biology. *J. Biosci.*, 2009; 34: 495–501
- [54] Okada T.S.: Transdifferentiation: Flexibility in Cell Differentiation. Clarendon Press, Oxford and New York, 1991
- [55] Pan G., Thomson J.A.: Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.*, 2007; 17: 42–49
- [56] Patel S.A., Sherman L., Munoz J., Rameshwar P.: Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2008; 56: 1–8
- [57] Phinney D.G.: Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*, 2007; 6: 2884–2889
- [58] Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143–147
- [59] Poulosom R., Alison M.R., Forbes S.J., Wright N.A.: Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.*, 2002; 197: 441–456
- [60] Quirici N., Soligo D., Bossolasco P., Servida F., Lumini C., Deliliers G.L.: Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 783–791

- [61] Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M., Reca R., Ratajczak J.: Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2004; 42: 139–146
- [62] Ratajczak M.Z., Kucia M., Ratajczak J., Zuba-Surma E.K.: A Multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSELs) from adult tissues. *Micron*, 2009; 40: 386–393
- [63] Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machaliński B., Kucia M.: Bone-marrow-derived stem cells – our key to longevity? *J. Appl. Genet.*, 2007; 48: 307–319
- [64] Roszek K., Komoszyński M.: Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pepowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 660–667
- [65] Rutenberg M.S., Hamazaki T., Singh A.M., Terada N.: Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int. J. Hematol.*, 2004; 79: 15–21
- [66] Sadiq T.S., Gerber D.A.: Stem cells in modern medicine: reality or myth? *J. Surg. Res.*, 2004; 122: 280–291
- [67] Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A.H.: Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.*, 2004; 10: 55–63
- [68] Sell S.: Adult stem cell plasticity: introduction to the first issue of stem cell reviews. *Stem Cell Rev.*, 2005; 1: 1–7
- [69] Serakinci N., Keith W.N.: Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur. J. Cancer*, 2006; 42: 1243–1246
- [70] Shen C.N., Burke Z.D., Tosh D.: Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. *Organogenesis*, 2004; 1: 36–44
- [71] Schofield R.: The relationship between the spleen colony-forming cells and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978; 4: 7–25
- [72] Slack J.M., Tosh D.: Transdifferentiation and metaplasia – switching cell types. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001; 11: 581–586
- [73] Suva D., Garavaglia G., Menetrey J., Chappuis B., Hoffmeyer P., Bernheim L., Kindler V.: Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.*, 2004; 198: 110–118
- [74] Tabata Y.: Recent progress in tissue engineering. *Drug Discov. Today*, 2001; 6: 483–487
- [75] Thowfeequ S., Myatt E.J., Tosh D.: Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev. Dyn.*, 2007; 236: 3208–3217
- [76] Tonti G.A., Mannello F.: From bone marrow to therapeutic applications: different behavior and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int. J. Dev. Biol.*, 2008; 52: 1023–1032
- [77] Tögel F., Westenfelder C.: Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.*, 2007; 236: 3321–3331
- [78] Tropel P., Noël D., Platel N., Legrand P., Benabid A.L., Berger F.: Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.*, 2004; 295: 395–406
- [79] Tsai R.Y., Kittappa R., McKay R.D.: Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev. Cell*, 2002; 2: 707–712
- [80] Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M., Hu W.S.: Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005; 100: 12–27
- [81] Urbaniak-Kujda D., Wołowiec D., Tomaszewska-Toporska B., Kapelko-Stowik K., Kuliczowski K.: Mezenchymalne komórki macierzyste: ich biologia i perspektywy zastosowań klinicznych. *Acta Haematol. Pol.*, 2005; 36: 161–166
- [82] Vassilopoulos G., Russell D.W.: Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2003; 13: 480–485
- [83] Villavicencio E.H., Walterhouse D.O., Iannaccone P.M.: The sonic hedgehog-patched-Gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000; 67: 1047–1054
- [84] Wagner W., Ho A.D.: Mesenchymal stem cell preparations – comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.*, 2007; 3: 239–248
- [85] Zipori D.: The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2006; 1: 95–102
- [86] Zuba-Surma E.K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: „Small stem cells” in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry A*, 2009; 75: 4–13

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

