

(99)

Komórki macierzyste – nowe perspektywy w leczeniu chorób siatkówki

Stem cells – new perspectives in the treatment of retinal disorders

Anna Machalińska¹, Danuta Karczewicz², Bogusław Machaliński³

¹ Z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik: dr hab. n. med. Barbara Wiszniewska

² Z Katedry i Kliniki Okulistyki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Danuta Karczewicz

³ Z Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bogusław Machaliński

Summary: The progress of clinical science since a few last years indicates the possibility that stem cells could be used in the treatment of retinal disorders. The bone marrow seems to be the most available source of the stem cells for such purposes. This review describes the latest attempts to use the stem cells, isolated from the bone marrow, in the treatment of retinal injuries. The research performed in animal models, so far gives hope to use that innovatory strategy in humans.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, siatkówka, szpik kostny.

Key words: stem cells, retina, bone marrow.

Wraz z odkryciem w latach 70. XX wieku procesu apoptozy w komórkach zdrowego organizmu runął mit o statycznej naturze komórek i tkanek. Żywy organizm stanowi strukturę wysoce dynamiczną, gdzie obumarłe, zużyte komórki zastępowane są przez nowe – generowane poprzez proliferację komórek macierzystych. Pula komórek macierzystych utrzymuje w równowadze populację komórek somatycznych, a tym samym odpowiada za regenerację narządów i tkanek. Do niedawna komórki macierzyste identyfikowano tylko w niektórych obszarach naszego organizmu (układ krwiotwórczy, nabłonek jelita, rogówki czy naskórek), dziś wiadomo już, że są one obecne niemal we wszystkich tkankach, także w siatkówce oka. Nowe odkrycia i rozwój nowoczesnych technologii w szybkim tempie prowadzą do poszerzenia naszej wiedzy na temat komórek macierzystych oraz dają coraz bardziej uzasadnioną nadzieję na ich zastosowanie także w leczeniu chorób siatkówki.

Czym są komórki macierzyste?

Komórki macierzyste (KM) stanowią heterogenną populację nieodróżnionych komórek, wyróżniającą się dwiema zasadniczymi cechami: zdolnością do samoodnowy oraz zdolnością do różnicowania się w kierunku komórek dojrzałych. Samoodnowa jest procesem, w którym w wyniku podziału pojedynczej komórki macierzystej powstają dwie identyczne komórki macierzyste potomne lub jedna komórka macierzysta i komórka ulegająca stopniowemu różnicowaniu i dojrzewaniu. KM cechują się dużą heterogennością, różnią się między sobą potencjałem proliferacyjnym oraz stopniem możliwości dalszego różnicowania. I tak np. komórka totipotencjalna (zapłodniona komórka jajowa) daje początek wszystkim komórkom człowieka i płodu, komórki pluripotencjalne dają początek wszystkim komórkom człowieka, komórki multipotencjalne różnicują się odpowiednio w tkanki

w obrębie ekto-, endo- lub mezodermy, a ukierunkowane tkanekowo komórki macierzyste dają początek wyłącznie komórkom konkretnego narządu lub tkanki (1).

Szpik kostny jest bardzo charakterystyczną tkanką o rozbudowanym układzie naczyniowym, tworzy specyficzne mikrośrodowisko, wzbogacone w liczne chemoatraktanty oraz czynniki wzrostu. Warunki te są idealne dla przeżycia i różnicowania komórek krwiotwórczych, ale także, jak dowodzą badania ostatnich lat, umożliwiają osiedlanie się innych frakcji komórek macierzystych. Szpik kostny jest atrakcyjną „kryjówką” dla różnych frakcji komórek macierzystych, począwszy od komórek wczesnych pluri- czy multipotencjalnych, a skończywszy na komórkach tkanekowo ukierunkowanych, swoistych dla różnych tkanek (2,3). Wykazano, iż komórki te, izolowane i umieszczone w odpowiednich warunkach, proliferują i różnicują się w dojrzałe komórki różnych tkanek, w tym także siatkówki. Niehematopoetyczne komórki macierzyste (CD45-), izolowane ze szpiku kostnego człowieka i inkubowane razem z komórkami nabłonka barwnikowego w warunkach *in vitro*, wykazują ekspresję swoistych markerów charakterystycznych dla fotoreceptorów, m.in. opsyny oraz komórek dwubiegunowych – kinazy białkowej C (PKC). Nabłonek barwnikowy pełni tu funkcję odżywczą oraz przyczynia się do stworzenia mikrośrodowiska imitującego fizjologiczne warunki przestrzeni podsiatkówkowej (4). Frakcja wczesnych króliczych komórek niehematopoetycznych macierzystych (CD90+), poddana hodowli w obecności tauryny, EGF i activiny A, wykazuje ekspresję białek swoistych dla fotoreceptorów (rodopsyna), komórek amakrynowych (białko wiążące komórkowy kwas retinowy – CRABP1) i nerwowych komórek progenitorowych (nestyna), zarówno w badaniach immunocytochemicznych, jak i w badaniu na poziomie mRNA. Użyte w doświadczeniu tauryna, EGF i activina A są obecne fizjologicznie

w siatkówce i niezbędne do różnicowania się i przeżycia fotoreceptorów zarówno w życiu prenatalnym, jak i postnatalnym (5).

Komórki macierzyste szpiku są populacją mobilną. Krążą one w ustroju wraz z krwią, docierając do wszystkich tkanek i narządów. Ma to szczególne znaczenie w przypadku tkanek rozproszonych, jak np. tkanka krwiotwórcza, mięśniowa czy nerwowa. Ich ruch i mobilność regulowane są przez szereg chemokin/cytokin wydzielanych przez komórki różnych tkanek i narządów. Poszczególne chemokiny wiążą się bezpośrednio z receptorami chemokinowymi obecnymi na powierzchni różnych typów komórek macierzystych. Uszkodzony nabłonek barwnikowy siatkówki wydziela więc szereg chemoatraktantów, które selektywnie wiążą krążące siatkówkowe komórki macierzyste. Potwierdzono to w warunkach laboratoryjnych, gdyż pozyskane ze szpiku komórki macierzyste, przyciągane przez uszkodzony nabłonek barwnikowy w teście chemotaksji, wykazywały obecność markerów swoistych dla wczesnych komórek siatkówki (6).

Krążenie komórek macierzystych w łożysku naczyniowym powoduje, iż różne ich frakcje są obecne w różnych tkankach i organach. Komórki krwiotwórcze można więc izolować z mięśni czy tkanki nerwowej, macierzyste komórki mięśniowe, nerwowe lub inne są obecne w szpiku itd. Niemniej jednak szpik kostny pełni funkcję centralną i pozostaje rezerwuarem komórek macierzystych różnych typów. Wykazano, iż komórki macierzyste deponowane w szpiku są mobilizowane do krwi obwodowej pod wpływem czynników wydzielanych przez uszkodzone tkanki i następnie kierowane w miejsce uszkodzenia (7). Dane te przemawiają za tym, iż krążące komórki macierzyste uczestniczą w patofizjologicznej regeneracji uszkodzonych narządów. Mobilizację komórek macierzystych można też wywołać sztucznie za pomocą środków farmakologicznych, podając chemioterapeutyki (np. cyklofosfamid), czynniki wzrostu (np. czynnik wzrostu granulocytów – G-CSF) lub ich odpowiednią kombinację. Stężenie krążących komórek macierzystych wydatnie zwiększa się również podczas stresu, jakim jest poród, dzięki czemu są one obecne w zwiększonej ilości we krwi pępowinowej.

Pozyskiwanie komórek macierzystych

Komórki macierzyste w terapii mogą być pozyskiwane z kilku źródeł: ze szpiku kostnego, zarówno od dawców żywych, jak i od heparynizowanych (8), z krwi obwodowej, np. w warunkach ich sztucznej mobilizacji, a także z krwi pępowinowej lub z innych tkanek.

W ostatnich latach wykazano obecność komórek macierzystych w obrębie siatkówki człowieka, głównie w obszarze nabłonka barwnikowego ciała rzęskowego. Zdolność powyższych komórek do różnicowania się w dojrzałe, nerwowe i glejowe elementy siatkówki została potwierdzona zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* (9,10). Niemniej jednak z uwagi na obiektywne trudności w pozyskiwaniu komórek macierzystych z siatkówki szpik kostny, mobilizowana krew obwodowa czy krew pępowinowa stają się najbardziej dostępnymi rezerwuarami komórek macierzystych wykorzystywanych w terapii.

Komórki macierzyste stanowią populację stosunkowo nieliczną. Przyjmuje się, iż średnio jedna komórka na 10^3 - 10^4 wszystkich komórek jednojądrzastych szpiku to komórka macierzysta. Ich stosunkowo duża liczba u osobników młodych, roz-

wijających się stopniowo zmniejsza się z wiekiem (2). KM mają morfologię małego limfocytu o skondensowanej cytoplazmie i dużym jądrze. Są one „liniowo ujemne”, co oznacza, iż nie mają swoistych markerów, receptorów powierzchniowych na wzór komórek dojrzałych. W chwili obecnej niezwykle trudno jest wyizolować homogenne populacje poszczególnych rodzajów komórek macierzystych. Prymitywne frakcje komórkowe izolowane ze szpiku kostnego stanowią zawieszinę różnych typów komórek macierzystych, nie do końca jeszcze precyzyjnie zdefiniowanych, mogące w różnych warunkach hodowli różnicować się w odmienne linie komórkowe. Wyodrębnienie ich spośród innych komórek jednojądrzastych odbywa się często zgodnie z zasadą selekcji negatywnej – poprzez eliminację komórek hematopoetycznych (CD45+) i różnicowanych. Tak więc najczęściej jesteśmy w stanie pozyskać jedynie frakcję komórek wzbogaconą w komórki macierzyste, swoisty „koktajl” z różnych typów komórek, w tym komórek macierzystych. Dynamiczny rozwój nauki wciąż pogłębia naszą wiedzę na temat konstelacji białek obecnych na powierzchni poszczególnych rodzajów komórek macierzystych, pozwalając ustalać coraz precyzyjniej panel receptorów powierzchniowych determinujących ich fenotyp. Znaczącym postępem w metodach izolacji komórek okazało się wprowadzenie w ostatnich latach nowoczesnych urządzeń sortujących sprzężonych z cytometrem przepływowym, umożliwiających pozyskiwanie komórek na podstawie charakterystycznej konfiguracji receptorów na ich powierzchni.

Komórki macierzyste a regeneracja siatkówki

Dynamiczny rozwój badań nad biologią komórek macierzystych zrodził pomysł opracowania nowoczesnych metod terapeutycznych opartych na wykorzystaniu komórek macierzystych w praktyce klinicznej. Podejmowane są już liczne próby aplikacji komórek macierzystych w leczeniu uszkodzeń niedokrwiennych u ludzi, m.in. zawału mięśnia sercowego.

Badania nad użyciem komórek macierzystych w regeneracji siatkówki nie są jeszcze tak zaawansowane i podejmowane są głównie w modelach zwierzęcych. W opublikowanych pracach frakcje komórkowe wzbogacone w komórki macierzyste, znakowano za pomocą barwników fluorescencyjnych i wprowadzano w okolicę tylnego odcinka gałki ocznej. Dokonywano tego w dwojaki sposób: przez wstrzykiwanie ich do komory ciała szklistego bądź podanie bezpośrednio do przestrzeni podsiatkówkowej i wywołanie przejściowego uniesienia części sensorycznej. W przypadku komórek wprowadzanych doszkliskowo dodatkowo indukowano uszkodzenie siatkówki poprzez mechaniczne uszkodzenie jej igłą lub poprzez fotokoagulację wiązką laserową. Wywołany uszkodzeniem siatkówki odczyn zapalny wydatnie zwiększał wbudowywanie się podanych komórek macierzystych nie tylko w obszar uszkodzonego pola siatkówki, ale także w obszar do niej przylegający. Potwierdza to zatem pośrednio wcześniejsze obserwacje, iż migracja komórek macierzystych uwarunkowana jest oddziaływaniem ligand-receptor i zależy od szeregu chemoatraktantów wydzielanych przez uszkodzone tkanki. Rozmieszczenie, fenotyp oraz liczba podanych komórek w siatkówce oceniano *post mortem* za pomocą technik histologicznych oraz immunocytochemicznych z użyciem mikroskopu konfokalnego. W miejscu uszkodzenia obserwowano nie tylko miejscową proliferację komórek warstwy

jądrzastej zewnętrznej, ale także, co równie istotne, obecność podanych komórek znakowanych barwnikiem w warstwie jądrzastej wewnętrznej i wewnętrznej. Podane komórki wykazywały ekspresję markerów swoistych dla neuroblastów (nestyna), dla dojrzałych komórek nerwowych (MAP 2 – anti-microtubule-associated protein 2, calbidyna), dojrzałych komórek siatkówki (rodopsyna) oraz komórek glejowych (GFAP). Wskazuje to, iż zastosowane komórki macierzyste mogą mieć udział w odbudowie wszystkich warstw siatkówki w miejscu uszkodzenia. Obecność opisywanych komórek obserwowano w miejscu uszkodzenia nie tylko bezpośrednio po podaniu (2 tygodnie), ale także po rocznej obserwacji (11,12).

Istnieje również szereg doniesień informujących, że szpik kostny zawiera frakcję endotelialnych komórek macierzystych/progenitorowych uczestniczących w tworzeniu naczyń krwionośnych w procesie angiogenezy zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (neowaskularyzacja) (13,14). Pojawiły się zatem próby zastosowania niehematopoetycznych, szpikowych komórek macierzystych w leczeniu chorób degeneracyjnych siatkówki typu *retinitis pigmentosa* (RP). Choroby te, uwarunkowane mutacjami szeregu genów, związane są z utratą komórek pręcikonośnych i postępującą atrofią naczyń, co w efekcie prowadzi do nieodwracalnego pogorszenia widzenia, a ostatecznie utraty widzenia centralnego. Istotą koncepcji stanowi zahamowanie degeneracji naczyniowej i pośrednio spowolnienie utraty fotoreceptorów z użyciem frakcji komórek szpikowych wzbogaconej w endotelialne komórki macierzyste. Wyizolowane ze szpiku komórki o fenotypie lin- (frakcja komórek jednojądrzastych pozbawiona komórek liniowo ukierunkowanych) podawano doszkliskowo myszom z mutacją genów analogiczną do defektu obserwowanego u ludzi z RP (rd1, rd10). Podczas półrocznej obserwacji oceniano strukturę histologiczną oraz stan naczyń siatkówki, a także wzajemny stosunek pręcików i czopków w różnych odstępach czasowych od podania komórek. Wykazano, iż zastosowane komórki w znacznym stopniu zahamowały postępującą regresję naczyń i jednocześnie wywarły silnie neurotroficzny wpływ na warstwę jądrzastą zewnętrzną. Wyrażało się to wyraźnym spowolnieniem utraty fotoreceptorów, wzrostem ekspresji genów hamujących proces apoptozy oraz poprawą stanu funkcjonalnego siatkówki w badaniach elektrofizjologicznych. Najbardziej jednak istotny wydaje się fakt, iż wśród zachowanych komórek dominowały komórki czopkonośne. Potwierdza to dotychczasowe hipotezy, iż utrata czopków ma charakter wtórny w miarę postępującego spadku potrzeb metabolicznych siatkówki i utraty pręcików. Zastosowanie autologicznych przeszczepów szpikowych komórek zawierających frakcję endotelialnych komórek macierzystych daje nadzieję na zahamowanie procesu degeneracji siatkówki i utraty widzenia centralnego u chorych z RP (15).

Jak wspomniano, podejmowane są także próby podawania frakcji wzbogaconych w komórki macierzyste do przestrzeni podsiatkówkowej z wytworzeniem przejściowego odwarstwienia części sensorycznej. Ta forma wprowadzania komórek macierzystych nie indukowała powstania nowotworzenia, przecieku czy innych zaburzeń naczyniowych. W trakcie 3-miesięcznej obserwacji wykazano obecność podanych komórek w warstwie jądrzastej zewnętrznej na obszarze pierwotnie odwarstwionej

siatkówki. Ponadto udowodniono proces morfologicznego i funkcjonalnego różnicowania się podanych komórek w fotoreceptory, wykazując obecność w nich rodopsyny oraz synaptofizyny – białka biorącego bezpośredni udział w przekazywaniu neuronalnym (5).

Jak wskazują przedstawione badania, w warunkach uszkodzenia siatkówki – wywołanego mechanicznie, wiązką laserową czy poprzez przejściowe jej odwarstwienie – podane komórki macierzyste reagują na uwolnione mediatory i z powodzeniem mogą wbudowywać się w siatkówkę, różnicując się w charakterystyczne dla niej komórki.

Podsumowanie

Rzeczywista nauka w ostatnich latach doprowadziła do pojawienia się zupełnie nowych perspektyw terapeutycznych opartych na możliwości wykorzystania komórek macierzystych. Pomimo istnienia wielu potencjalnych trudności metody te mogą stać się przełomem w leczeniu wielu dotychczas nieuleczalnych chorób siatkówki. Istnieje możliwość wykorzystania komórek macierzystych zarówno w bezpośredniej regeneracji i odbudowie siatkówki, jak i pośrednio poprzez udział w jej unaczynieniu. Stymulacja bądź hamowanie rekrutacji komórek macierzystych do siatkówki mogą stać się przełomowym krokiem w leczeniu schorzeń zarówno o podłożu naczyniowym, jak i degeneracyjnym.

PIŚMIENNICTWO:

1. Ratajczak M.Z., Goździk J.: *Komórki macierzyste – klucz do długowieczności*. Medycyna po Dyplomie, 2004, 13, 1-8.
2. Kucia M. et al.: *Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells* (Review). Leukemia, 2005, 19, 1118-1127.
3. Ratajczak M.Z., Kucia M., Majka M., Reza R., Ratajczak J.: *Heterogeneous populations of bone marrow stem cells—are we spotting on the same cells from the different angles?* (Review). Folia Histochem. Cytobiol., 2004, 42, 139-146.
4. Chiou S.H. et al.: *A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 326, 578-585.
5. Kicic A., Shen W.Y., Wilson A.S., Constable I.J., Robertson T., Rakoczy P.E.: *Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye*. J. Neurosci., 2003, 23, 7742-7749.
6. Li Y. et al.: *Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2006, 47, 1646-1652.
7. Kucia M. 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, 2005.
8. Machalinski B. et al.: *Heparinized cadaveric organ donors (HCOD) – a potential source of hematopoietic cells for transplantation and gene therapy*. Transplantation, 2001, 71, 1003-1007.
9. Coles B.L. et al.: *Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 15772-15777.
10. Mayer E.J. et al.: *Neural progenitor cells from postmortem adult human retina*. Br. J. Ophthalmol., 2005, 89, 102-106.

11. Tomita M. et al.: *Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina*. Stem Cells, 2002, 20, 279-283.
12. Minamino K. et al.: *Long-term survival of bone marrow-derived retinal nerve cells in the retina*. Neuroreport, 2005, 16, 1255-1259.
13. Otani A., Kinder K., Ewalt K., Otero F.J., Schimmel P., Friedlander M.: *Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis*. Nat. Med., 2002, 8, 1004-1010.
14. Tomita M. et al.: *Choroidal neovascularization is provided by bone marrow cells*. Stem Cells, 2004, 22, 21-26.
15. Otani A. et al.: *Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells*. J. Clin. Invest., 2004, 114, 765-774.

Praca wpłynęła do Redakcji 01.08.2006 r. (881).
Zakwalifikowano do druku 24.10.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
prof. dr hab. n. med. Bogusław Machaliński
Katedra i Zakład Patologii Ogólnej
Pomorskiej Akademii Medycznej
al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

PLAN IMPREZ POD PATRONATEM PTO – ROK 2007: **www.pto.com.pl**

ZJAZDY KRAJOWE

- 25.02.-02.03.07 Kurs Atestacyjny – Łódź
17.03.07 Sympozjum Alergologiczne – Łódź
12-14.04.07 XXVIII Sympozjon Retinologiczny – Poznań
25-27.05.07 Sympozjum Okulistyki Dziecięcej
- Augustów
31.05.-02.06.07 Sympozjum Sekcji Okulistyki Wojskowej
PTO – Mikołajki
20-23.06.07 XLII Zjazd Okulistów Polskich PTO
- Bydgoszcz
14-15.09.07 II Sympozjum Sekcji Neurookulistyki
i Elektrofizjologii PTO
– Międzyzdroje
20-22.09.07 VII Sympozjum Sekcji Soczewek
Kontaktowych PTO – Warszawa

DODATKOWE IMPREZY ZGŁOSZONE DO KALENDARZA ZJAZDOWEGO NIEOBJĘTE PATRONATEM PTO – ROK 2007:

- 18-19.05.07 VI Łódzkie Spotkania Jaskrowe – Łódź

ZJAZDY ZAGRANICZNE – ROK 2007:

- 28-31.03.07 6th International Glaucoma Symposium
Athens, Grec
06-10.06.07 2007 Congress of the European Society
of Ophthalmology, Vienna, Austria
www.soe2007.org
08-12.09.07 Sympozjum ESCRS Sztokholm, Szwecja
13.09.07 Sympozjum DOG Berlin, Niemcy