

AMPAr). System jest aktywny również w stanie czuwania, lecz jego wydajność dramatycznie rośnie w czasie snu. W stanie czuwania aktywność obejmuje jedynie górne warstwy kory mózgowej. Po wejściu w stan snu aktywność systemu obejmuje cały mózg. Pełne aktywowanie systemu następuje zarówno w śnie naturalnym, jak i farmakologicznym.

Przy deficycie snu efektywność systemu glicyfacyjnego jest niezadowalająca. W mózgu pozostają nieusunięte substancje toksyczne oraz beta amyloidy. Nadmiar beta amyloidów w mózgu powoduje intensyfikację procesu usuwania z połączeń

synaptycznych AMPAr. Potwierdzają to wyniki badań nad deficytem snu u myszy. W badaniach tych stwierdzono, iż deficyt snu powoduje znaczne obniżenie poziomu AMPAr w hipokampie. Poziom ten wraca do normy, gdy deficyt snu zostaje skompensowany.

Wśród badaczy panuje obecnie zgodny pogląd, iż niska efektywność systemu glicyfacyjnego związana z deficytem snu przyczynia się do obniżenia sprawności pamięciowej i może stanowić ważny czynnik patogenny w chorobie Alzheimerera.

Prof. dr hab. Tadeusz Marek, Ośrodek Neurobiologii, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie. E-mail: tademarek@gmail.com.

TECHNOLOGIE XXI WIEKU I KOMÓRKI MACIERZYSTE W BADANIACH I TERAPII SCHORZEŃ NEUROLOGICZNYCH

Leonora Bużańska, Marzena Zychowicz, Anna Sarnowska (Warszawa)



Wiarygodne, oparte o najnowsze osiągnięcia nauki systemy hodowli *in vitro* ludzkich komórek macierzystych (KM), są kluczowe w celu ustalenia potencjału terapeutycznego wybranych populacji komórek. Stosowane są również do badań farmakologicznych i toksykologicznych wprowadzanych do terapii lub już stosowanych leków.

Przełom technologiczny ostatnich lat w dziedzinie badań nad komórkami macierzystymi oraz bioinżynierią mikrośrodowiska, w którym komórki hodowane są poza ustrojem człowieka, umożliwił stworzenie systemów „biomimetycznych”, to znaczy takich, które przypominają warunki naturalnie panujące w organizmie. Strategia tworzenia takich systemów badawczych jest dwukierunkowa: 1) prowadzi do otrzymania układu różnych mikrośrodków „biomimetycznych” w mikroskali, umożliwiającących wydajne i szybkie badanie komórek ludzkich na mikroplatformach, co znajduje zastosowanie w toksykologii i farmakologii; 2) umożliwia otrzymanie w hodowli *in vitro* układu komórek, które tworzą w makroskali tkanki lub organoidy, a nawet całe narządy, co ma swoje zastosowanie w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Mózg człowieka jest szczególnie skomplikowany w swej budowie, dlatego niezwykłym osiągnięciem ostatnich dwóch lat było otrzymanie w hodowli organoidy, która zarówno w budowie, jak i funkcji przypomina korę rozwijającego się mózgu.

W strategiach „mikro” i „makro” stosowana jest personalizacja układu badawczego, tj. wyprowadzenie od pacjenta linii komórek macierzystych, która stanowi model schorzenia o określonym podłożu genetycznym i pozagenetycznym, właściwym tylko dla tego pacjenta. Stało się to możliwe dzięki nowej technologii otrzymywania tzw. indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC, ang. *induced pluripotent stem cells*) z każdej tkanki dorosłego człowieka.

W tym artykule zostaną przedstawione nowe technologie otrzymywania komórek macierzystych i trójwymiarowych systemów hodowli w skali „mikro” i „makro”, które można zastosować do badań i terapii spersonalizowanej schorzeń neurologicznych.

Rodzaje ludzkich komórek macierzystych

Unikalne właściwości, które charakteryzują komórki macierzyste, to ich potencjał do samoodnawiania swojej populacji i do różnicowania się w różne typy komórek organizmu. Znane systemy klasyfikacji komórek macierzystych dotyczą bądź pochodzenia tych komórek (zarodkowe i tkankowe, określane również jako somatyczne), bądź ich funkcjonalności, w związku z odmienną zdolnością do różnicowania (totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne, unipotencjalne). Komórki totipotencjalne posiadają zdolność do różnicowania się we wszystkie rodzaje

komórek organizmu oraz w tkanki pozazarodkowe, komórki pluripotencjalne różnicują się we wszystkie rodzaje komórek organizmu, multipotencjalne są zdolne do wytworzenia kilku typów komórek, zwykle w obrębie tej samej tkanki, natomiast unipotencjalne utrzymują zdolność do podziałów, ale różnicują się tylko w jeden typ komórek. Tabela 1 przedstawia schemat zależności pomiędzy pochodzeniem komórek macierzystych, a ich funkcjonalnością, czyli zdolnością do różnicowania, ze wskazaniem na źródła, z których te komórki są pozyskiwane.

Źródła pozyskiwania ludzkich komórek macierzystych, które można zastosować w diagnostyce i terapii „spersonalizowanej” schorzeń neurologicznych

Pojęcie medycyny regeneracyjnej „spersonalizowanej” dotyczy zastosowania komórek własnych pacjenta do potencjalnej terapii komórkowej lub diagnostyki medycznej.

Terapia regeneracyjna z wykorzystaniem komórek macierzystych w chorobach neurodegeneracyjnych, np. chorobie Parkinsona czy stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS), jak i w uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego powstałych w wyniku udaru mózgu czy urazu rdzenia kręgowego, stała się przedmiotem zainteresowania środowisk medycznych pod koniec XX wieku, z chwilą opracowania metody otrzymania i hodowli ludzkich zarodkowych komórek macierzystych. Jednak zagadnienia etyczne-prawne i zagrożenia onkogenetyczne stanowią ciągle nierozwiązany problem praktyczny w stosowaniu zarodkowych komórek macierzystych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych. Stąd poszukiwanie innych źródeł komórek przydatnych w rekonstrukcji uszkodzonego układu nerwowego. Pierwszym, naturalnym miejscem poszukiwania był Ośrodkowy Układ Nerwowy (OUN) człowieka.

W roku 1928 Santiago Ramón y Cajal, hiszpański neuroanatom, prekursor neurobiologii stwierdził: „w mózgu człowieka drogi nerwowe są ustalone, wszystko musi umrzeć, nic się nie odnowi”. Ten dogmat obowiązywał w naukach medycznych ponad 70 lat, zanim zidentyfikowano w mózgu człowieka miejsca, w których powstają nowe neurony. Obszary te, zwane strefami neurogennymi to: strefa podkomorowa wyściełająca komory boczne mózgowia (SVZ, ang. *subventricular zone*) oraz strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (SGZ, ang. *subgranular zone*). W strefach tych obecne są neuralne komórki macierzyste (NSC, ang. *Neural Stem Cells*) odpowiedzialne za zdolności regeneracyjne mózgu. Aktywność

neurogeną stwierdzono również w innych częściach OUN człowieka, ale dotyczy to neurogenezy indukowanej zwykle uszkodzeniem lub innym bodźcem zewnętrznym. Bardzo ograniczona dostępność ludzkich NSC oraz inwazyjny sposób ich otrzymywania to dwie główne przeszkody w pozyskiwaniu tych komórek do przeszczepów autologicznych, dlatego główny nurt badań związany z wykorzystaniem NSC do strategii naprawczych mózgu to stymulacja podziałów tych komórek w ich niszach endogennych. Poszukiwania optymalnego źródła komórek macierzystych do terapii schorzeń neurologicznych skupiły się na łatwo dostępnych tkankach organizmu dorosłego, takich jak szpik kostny, tkanka tłuszczowa, bądź krew obwodowa, jak również na tkankach „popłodu”, takich jak krew pępowinowa, czy też Galareta Whartona izolowana ze sznura pępowinowego. Takie tkanki pochodzenia płodowego okazały się bogate w niezwykle „plastyczne” komórki macierzyste, posiadające zdolność do samoodnawiania się, ale również do różnicowania w komórki innych tkanek. Nasz zespół brał udział w pionierskich badaniach na przełomie wieku XX i XXI, w których wykazaliśmy, że komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej mogą przekraczać bariery tkankowe i różnicować się w komórki typowe dla mózgu: neurony, astrocyty i oligodendrocyty. W Polsce, w Instytucie Centrum Zdrowia Dziecka, przy współpracy z naszym zespołem przeprowadzono pierwszą monitorowaną klinicznie transplantację dokomorową autologicznych komórek krwi pępowinowej, ukierunkowanych neuralnie. Zaobserwowano nieznaczną, ale postępującą poprawę kliniczną stanu pacjenta. Przeszczep dokomorowy okazał się bezpieczny w czasie ponad 6-letniej prospektywnej obserwacji tego przypadku.

Badania przedkliniczne prowadzone w wielu laboratoriach na świecie wykazały, że somatyczne komórki macierzyste występujące w tkankach dojrziałych: szpiku kostnym, krwi obwodowej i tkance tłuszczowej, zwane mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC), wydają się stanowić najłatwiej dostępne i dobre źródło komórek terapeutycznych. Ten typ komórek znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu głównie tkanki chrzęstnej i kości, ale również w leczeniu schorzeń neurologicznych. Przeszczepione komórki mogą działać albo poprzez odbudowę uszkodzonego narządu, lub dzięki swoim właściwościom parakrynnym, aktywować endogenną regenerację tkanki. W pierwszym przypadku przeszczepione komórki różnicują się w komórki uszkodzonej tkanki i w tym celu zwykle podawane są dotkankowo (np. KM mezenchymalne różnicujące się w komórki chrząstki). W przypadku działania

Tabela 1. Schemat zależności pomiędzy pochodzeniem komórek macierzystych, a ich funkcjonalnością, ze wskazaniem na źródła z których te komórki są pozyskiwane.

<i>Pochodzenie</i> <i>Funkcjonalność</i>	<i>Zarodkowe</i>	<i>Tkankowe (Somatyczne)</i>		<i>Indukowane komórki macierzyste</i>
		<i>Płodowe</i>	<i>Dorosłe</i>	
totipotencjalne	Zygota, blastomery na wczesnych etapach rozwoju przed implantacją			
pluripotencjalne	Komórki węzła zarodkowego blastocysty		Komórki raka zarodkowego (ECC, ang. <i>embryonic carcinoma cells</i>) izolowane z guzów – potworniaków (teratom) powstających w jajnikach lub jądrach. Komórki pluriotencjalne w tkankach dorosłych, krążące w krwioobieg lub rezydujące w tkankach dorosłych (teorie w trakcie weryfikacji).	Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste otrzymane z komórek tkankowych (iPSC, ang. <i>induced pluripotent stem cells</i>) na drodze reprogramowania całkowitego.
multipotencjalne		Komórki listków zarodkowych (ekto-, endo- i mezodermy); komórki izolowane z krwi pępowinowej, Galarety Whartona (sznur pępowinowy), płynu owodniowego.	Hematopoetyczne KM (HSC, ang. <i>hematopoietic stem cells</i>) izolowane ze szpiku kostnego i krwi obwodowej, mezenchymalne KM (MSC, ang. <i>mesenchymal stem cells</i>) izolowane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej oraz innych tkanek, neuralne KM (NSC, ang. <i>neural stem cells</i>) z określonych obszarów mózgu i rdzenia kręgowego.	Indukowane tkankowe komórki macierzyste otrzymane na drodze przeprogramowania: reprogramowanie częściowe + czynniki różnicujące, czyli konwersji fenotypowej bezpośredniej, np. indukowane neuralne komórki macierzyste (iNSC, ang. <i>induced neural stem cells</i>) .
unipotencjalne			Komórki satelitowe mięśni szkieletowych lub komórki warstwy ziarnistej naskórka (keratynocyty).	

parakrynnego KM wydzielają czynniki wspomagające regenerację lub wpływają na odpowiedź immunologiczną mikrośrodowiska i wówczas podawane są systemowo, np. do krwioobiegu. Do tej pory udało się udowodnić głównie immunomodulacyjne i parakrynnne funkcje przeszczepianych komórek, natomiast nie wiadomo czy MSC, stosowane do terapii schorzeń neurologicznych mogą różnicować się *in vivo* w komórki tkanki nerwowej (choć takie dowody w badaniach przedklinicznych istnieją).

Na świecie zarejestrowano ponad 100 prób klinicznych z zastosowaniem KM tkankowych dotyczących schorzeń neurologicznych, takich jak stwardnienie rozsiane, guzy mózgu, udary mózgu, ciężkie uszkodzenie rdzenia kręgowego, stwardnienie zanikowe boczne, genetyczne i metaboliczne choroby OUN, w tym leukodystrofie oraz pojedyncze przypadki

innych chorób neurodegeneracyjnych, np. choroby Parkinsona i Alzheimerera.

W związku z głównie parakrynną i adjuwacją funkcją przeszczepianych komórek MSC, dla zwiększenia efektu terapeutycznego wskazane jest zastosowanie KM o większych zdolnościach do różnicowania, np. pluripotencjalnych zarodkowych komórek macierzystych. Okazało się jednak, że komórki takie, poza zastrzeżeniami etycznymi związanymi z ich pozyskiwaniem, sprawiają też duże kłopoty natury technicznej. Postęp technologiczny w dziedzinie bioinżynierii komórek macierzystych pozwolił rozwiązać ten problem, ponieważ dzisiaj potrafimy otrzymać w laboratorium pluripotencjalne komórki macierzyste praktycznie z każdej tkanki dorosłego organizmu.

Prof. John Gurdon i Prof. Shinya Yamanaka w roku 2012 otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie

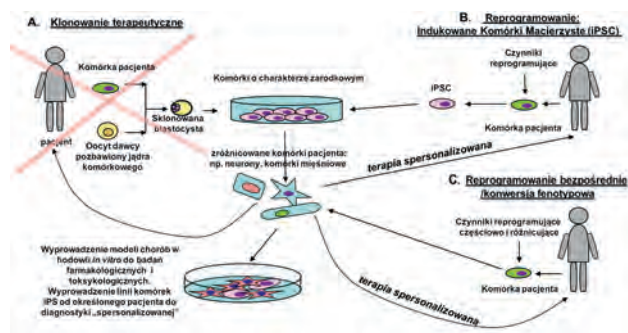
medycyny za wykazanie, że można zmodyfikować program informacji genetycznej wyspecjalizowanych komórek tkankowych w taki sposób, że staną się pluripotencjalne, czyli tak, jak w zarodku, zdolne do wytworzenia komórek typowych dla wszystkich tkanek dorosłego organizmu. Obydwu badaczom udało się „odmłodzić” materiał genetyczny komórki zróżnicowanej, w wyniku procesu odwrotnego do różnicowania, ale uczynili to na dwa różne sposoby. Gurdon wykorzystał do tego celu cytoplazmę oocyty, dzięki czemu przeszczepione jądro dojrzałej komórki znalazło się w mikrośrodowisku typowym dla wczesnego, rozwijającego się zarodka. Yamanaka opracował technikę reprogramowania materiału genetycznego komórki zróżnicowanej bez udziału środowiska komórki jajowej. Ominął w ten sposób trudny problem etyczny związany z wykorzystaniem oocytów ludzkich. Wprowadził do komórki zróżnicowanej mieszaninę genów typowych dla wczesnego zarodka. Mieszanina ta, zwana „koktajlem Yamanaki”, zawierała 4 geny kodujące czynniki transkrypcyjne (białka regulujące aktywność genów), odpowiedzialne za pluripotencjalność komórki i indukujące w jądrze komórkowym zmiany, podobnie jak cytoplazma oocyty z doświadczeń Gurдона.

Charakter translacyjny prac noblistów dla medycyny był oczywisty od samego początku. Dzięki pracom Gurдона opracowano metodę klonowania ssaków oraz metodę otrzymywania zarodkowych komórek pluripotencjalnych do celów terapeutycznych, tzw. „klonowania terapeutycznego” (Ryc. 1A). Z drugiej strony, Shinya Yamanaka udowodnił, że z dowolnej komórki somatycznej można otrzymać tzw. indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (Tabela 1, Ryc. 1B) z pominięciem materiału zarodkowego. Dro-

indukcji pluripotencjalności w komórkach somatycznych ssaków, wybrał 24 geny potencjalnie spełniające tę funkcję. Do fibroblastów myszy wprowadzał różne kombinacje wybranych genów przy pomocy wektorów retrowirusowych, a następnie badał ich wpływ na tworzenie kolonii podobnych morfologicznie do kolonii komórek zarodkowych. Wyniki doświadczeń zawęziły listę genów „kandydatów” najpierw do 7-miu, a potem do 4-rech: Oct4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc (OSKM), stanowiących obecnie podstawowy skład mieszaniny reprogramującej. Skuteczność wybranych czynników transkrypcyjnych do indukcji pluripotencjalności została potwierdzona we wszystkich badanych do tej pory somatycznych komórkach ludzkich, m.in. zróżnicowanych komórkach trzustki, wątroby i jelita, a także w fibroblastach, keratynocytach, limfocytach i komórkach neuralnych, sugerując, że jest to proces uniwersalny. Kolejne badania prowadzone w wielu laboratoriach na świecie wykazały, że można jeszcze bardziej zredukować liczbę i kompozycję wprowadzanych czynników transkrypcyjnych niezbędnych do indukcji pluripotencjalności, a zmiany w kombinacji tych czynników zależą od wzoru ich endogennej ekspresji w określonych typach komórek. Jedynie czynnik Oct4 pozostaje niezbędny do bezpośredniego i skutecznego reprogramowania w każdym badanym przypadku.

Wnikliwe badania nad mechanizmami molekularnymi regulującymi reprogramowanie komórek umożliwiło opracowanie nowych, bardziej bezpiecznych metod indukcji pluripotencjalności w komórkach somatycznych. Pierwsze doświadczenia w laboratorium Prof. Yamanaki prowadzono stosując jako nośniki materiału genetycznego retrowirusy, które powodowały wbudowanie wprowadzonych genów do DNA komórki. Niesie to za sobą niebezpieczeństwo mutacji i nowotworzenia. Obecnie opracowano szereg nowych metod „nieintegracyjnych”, w których genetyczne czynniki reprogramujące wprowadzane są do komórki czasowo lub w formie białek rekombinowanych, czy też RNA. Stosowanie takich metod przybliży potencjalne wykorzystanie komórek iPS w klinice. Dlatego dla potrzeb medycyny aplikacyjnej główny nurt prowadzonych badań dotyczy pokonywania przeciwności technicznych (skrócenie czasu stabilnej indukcji iPS, powtarzalność i wydajność metody) oraz potencjalnych niebezpieczeństw, jakie niesie za sobą zastosowanie komórek iPS w leczeniu ludzi.

Już teraz komórki iPS zróżnicowane w tkanki różnego typu wykorzystywane są do badań toksykologicznych i testów farmakologicznych. Stosowane są również do badania mechanizmów



Ryc. 1. Sposoby otrzymywania komórek stosowanych w terapii, także spersonalizowanej: klonowanie terapeutyczne (A), reprogramowanie (B), reprogramowanie bezpośrednie (C). Otrzymane komórki iPS mogą służyć jako komórki terapeutyczne (terapia spersonalizowana), ale również do wyprowadzania modeli chorób, badań farmakologicznych i toksykologicznych.

ga do sukcesu nie była prosta. Yamanaka, zanim określił skład swojego „koktajlu”, czyli mieszaniny genów kodujących czynniki transkrypcyjne niezbędne do

określonych chorób i modelowania ich przebiegu oraz sposobu terapii. Lista takich chorób, dla których udało się wyprowadzić linie komórek iPS jest bardzo długa, począwszy od chorób neurodegeneracyjnych, przez choroby serca, trzustki i układu krwionośnego. Modele komórkowe schorzeń neurologicznych, które udało się wyprowadzić z komórek iPS przedstawia Tabela 2. Należy podkreślić, że pomimo iż translacja komórek iPS do kliniki postępuje niezbyt szybko, to jest to postęp skuteczny i przeprowadzany z należytą starannością dotyczącą bezpieczeństwa pacjentów. Pierwsza próba kliniczna z komórkami iPS rozpoczęła się pod koniec 2013 roku w Japonii i dotyczy leczenia degeneracji plamki żółtej związanej z wiekiem (AMD, ang. *Age-related Macular Degeneration*) komórkami iPS pacjenta, zróżnicowanymi w komórki nabłonka pigmentowego siatkówki. Próbę poprzedziły przeszczepy auto i allogeniczne u naczelnych. Testy jakości dotyczyły bezpieczeństwa: wyeliminowania komórek niezróżnicowanych z materiału transplantacyjnego, testy na tumorogenność i dokładna charakterystyka otrzymanej populacji komórek.

Obok procesu reprogramowania somatycznych komórek do stadium pluripotencjalnej komórki macierzystej, zapoczątkowanego przez zespół prof. Yamana-ka, istnieje jeszcze proces nazywany reprogramowaniem

bezpośrednim (ang. *direct reprogramming*) lub konwersją fenotypową (Ryc. 1 C). Badania ostatnich ok. 20 lat, również naszego zespołu, pokazały, że w warunkach hodowli *in vitro* komórki izolowane z jednego listka zarodkowego mogą zostać zróżnicowane w komórki pochodzące z odrębnego listka zarodkowego (np. komórki krwi pępowinowej, które pochodzą z mezodermy, zróżnicowano w komórki tkanki nerwowej, pochodzące z ektodermy). Po raz pierwszy efekt konwersji fenotypowej został pokazany w roku 1987, gdzie z fibroblastów, przy użyciu egzogennej ekspresji czynnika MYOD1, otrzymano miocyty. Wówczas proces ten nazwano ‘transdyferencjacją’ (co obecnie zakłada efekt spontanicznego przeróżnicowania). Badania ostatnich lat pozwoliły opracować protokoły indukowanej, szybkiej ‘konwersji fenotypowej’ pomiędzy komórkami zróżnicowanymi, bez konieczności indukcji stanu pluripotencjalności. W procesie ‘reprogramowania bezpośredniego’ stosuje się konkretnie zdefiniowane czynniki, takie jak czynniki transkrypcyjne typowe dla danej tkanki, czy związki chemiczne o ściśle określonym działaniu. Pośród wielu typów komórek otrzymanych przy użyciu protokołu konwersji fenotypowej znalazły się również dojrzałe, zróżnicowane komórki neuralne. Przy pomocy czynników transkrypcyjnych, specyficznych dla określonych fenotypów,

Tabela 2. Niektóre modele komórkowe schorzeń neurologicznych

<i>Choroba</i>	<i>Typ komórek wyprowadzonych z iPS</i>	<i>Testowane leki</i>
Adrenoleukodystrofia	Oligodendrocyty, neurony	Lowastatyna, fenylomaślan
Choroba Alzheimera	Neurony korowe	Inhibitor γ - β -sekretazy; kwas dokozaheksaenowy
Choroba Huntingtona	Neurony glutamatergiczne i GABAergiczne	-
Choroba Parkinsona (PD)	Neurony dopaminergiczne	Koenzym Q10, rapamycyna, GW5074, LRRK2-IN1, PD0325901
Choroba Machado-Josepha	Neurony glutamatergiczne	Kalpaina
Rdzeniowy zanik mięśni (SMA)	Motoneurony	Kwas walproinowy, tobramycyna
Rodzinną dysautonomia	Progenitory grzebienia nerwowego	Kinetyna, SKF-86-466
Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)	Motoneurony, komórki glejowe	Kwas anakardowy, trichostatyna A, spliceostatyna A, garcinol
Schizofrenia	Motoneurony	Loxapina, kwas walproinowy
Zespół Downa	Neurony, progenitory neuralne	-
Zespół Dravet	Neurony GABAergiczne	-
Zespół drżenia i ataksji związany z lamliwym chromosomem X	Neurony	-
Zespół Cockayne’a	iPSC i neurony	-
Zespół Retta	Neurony, progenitory neuralne	IGF-1, gentamycyna

udało się naukowcom w ten sposób z fibroblastów otrzymać różnego typu funkcjonalne neurony (np. motoneurony, neurony glutamatergiczne oraz dopaminergiczne). Czynnikiem transkrypcyjnym powtarzającym się dla wszystkich trzech typów neuronów w protokole konwersji fenotypowej jest ASCL1 (ang. *achaete-scute complex homologue 1*), co sugeruje wspólny mechanizm różnicowania tych komórek. Naukowcom udało się również otrzymać ludzkie indukowane komórki neuronalne (ang. *human induced neuronal cells, hiNC*) poprzez przeprogramowanie fibroblastów pochodzących od pacjentów z chorobą Alzheimera czy Parkinsona. Dzięki temu możliwe jest badanie *in vitro* patologii charakterystycznej dla określonej jednostki chorobowej oraz spersonalizowana diagnostyka z użyciem komórek otrzymanych od pacjenta.

Reprogramowanie bezpośrednie, omijając etap komórek pluripotencjalnych, skraca czas, w jakim otrzymujemy zróżnicowaną populację komórek, co już jest stosowane w diagnostyce, a może być w przyszłości metodą z wyboru wykorzystywaną w medycynie transplantacyjnej.

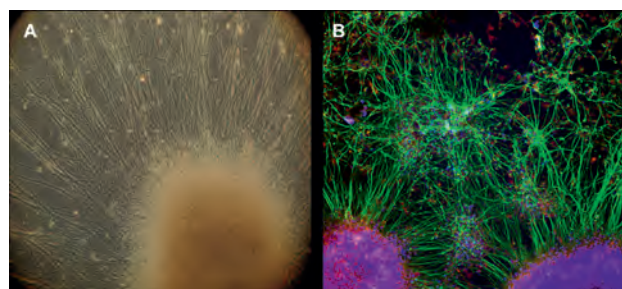
Inną, szczególnie cenną cechą komórek iPS jest ich potencjał rozwojowy podobny do zarodkowych komórek macierzystych, który w odpowiednich warunkach mikrośrodowiska *in vitro* umożliwia odтворzenie procesu rozwojowego i samoorganizację w struktury o charakterze organoidów przypominające korę mózgową, siatkówkę lub przysadkę mózgową. Opracowanie systemów hodowli komórkowych prowadzących do otrzymania organoidów i układów określonych tkanek w skali „makro” jest przełomem w dziedzinie inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej. Z drugiej strony miniaturyzacja hodowli komórkowych i opracowanie „inteligentnych” platform badawczych dla komórek macierzystych umożliwia rozwój badań podstawowych, farmakologicznych i toksykologicznych. Kolejny rozdział podsumowuje zastosowanie nowych technologii w dziedzinie bioinżynierii mikrośrodowiska komórek macierzystych.

Rozwój technologiczny systemów hodowli neuralnych komórek macierzystych: bioinżynieria mikrośrodowiska

Hodowle konwencjonalne dwuwymiarowe są wygodne do utrzymywania stałego wzrostu komórek macierzystych, ale nie zapewniają odpowiednich warunków do ich właściwego różnicowania. Dopiero zastosowanie formy wzrostu hodowli w warunkach „pseudo-3D”, gdy powierzchnia szalki jest pokryta substancją biologicznie czynną w formie żelu (np. „matrigel”) umożliwia tworzenie struktur

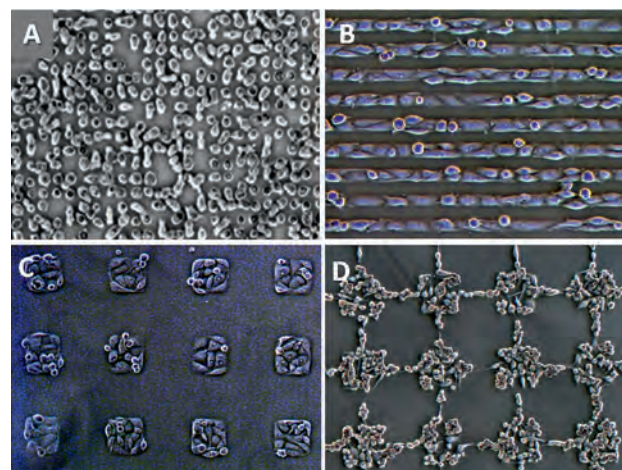
trójwymiarowych, zbudowanych z agregujących i oddziaływujących między sobą komórek, tworząc funkcjonalne sieci komórkowe. Takie skupiska komórek neuronalnych zróżnicowanych z ludzkich komórek iPS przedstawia Rycina 2.

Nowoczesne technologie mikro/nano drukowania (ang. *microprinting*) lub dozowania mikrokropki (ang. *microspotting*) białek funkcjonalnych (np. białek



Ryc. 2. Zdjęcie przyżyciowej hodowli komórek iPS w trakcie różnicowania neuronalnego (A). Neurony zróżnicowane z wyjściowej populacji indukowanych komórek macierzystych (iPS) znakowane na obecność białek typowych dla neuronów (B). Markery neuronalne: neurofilament 200 - kolor czerwony, beta-tubulina III - kolor zielony, jądra komórkowe - kolor niebieski.

łek macierzy zewnątrzkomórkowej) na powierzchni platformy do wzrostu komórek, umożliwiły otrzymanie określonych wzorów domen biofunkcyjnych, które są w stanie immobilizować do powierzchni nawet pojedyncze komórki lub też całe grupy komórek na różnych wzorach geometrycznych (Ryc. 3). Mikroplatformy z wykorzystaniem zminiaturyzowanych bioinżynijnych systemów hodowli komórek stanowią wygodny i uproszczony sposób identyfikacji oddziaływań komórek macierzystych ze składnikami



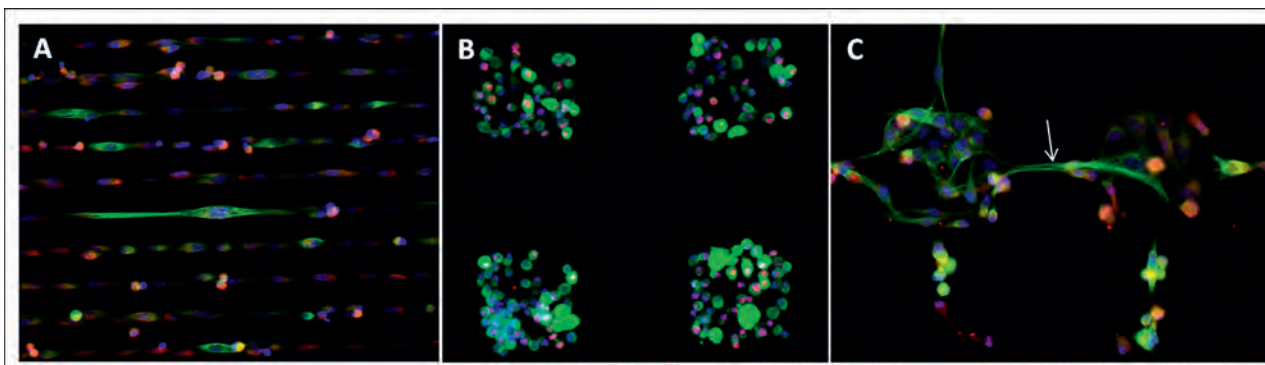
Ryc. 3. Neuralne komórki macierzyste pozycjonowane na domenach biofunkcyjnych uzyskanych metodą drukowania mikrokontaktowego: kwadraty o boku 10µm (A); linie o szerokości 20 µm (B); kwadraty o boku 100 µm (C); kwadraty o boku 120 µm połączone liniami (D). Według Postępy Biochemii, 2013, 59(2):175-187.

niszy i umożliwiają badanie mechanizmów molekularnych decydujących o ich losie. Rycina 4 przedstawia ściśle ukierunkowany wzrost specyficznych

wyrostków komórek nerwowych, zwanych aksonami, na specjalnie zaprojektowanej do takich badań mikroplatformie.

Zgodnie z licznymi doniesieniami literaturowymi wiadomo, że na los komórek, ich przeżycie i różnico-

kolagen, fibrynogen, chitosan, algininian i pochodne kwasu hialuronowego. Najczęściej używane biomateriały syntetyczne to: kwas poliglikolowy (PGA), kwas polimlekowy (PLA), polidioxanon (PDO), polikaprolakton (PCL) czy połączenia po-



Ryc. 4. Neuralne komórki macierzyste rosnące na domenach biofunkcyjnych o różnym kształcie (linie: A; kwadraty: B; kwadraty połączone liniami: C). Kolor zielony wskazuje obecność białka typowego dla neuronów: β -tubuliny III, kolor czerwony wskazuje na obecność białka typowego dla astrocytów: GFAP (A, C) oraz markera proliferacji: Ki67 (B). Jądra komórkowe wybarwione są na niebiesko. Strzałka wskazuje ukierunkowany wzrost aksonu. Według Postępy Biochemii, 2013, 59(2):175-187.

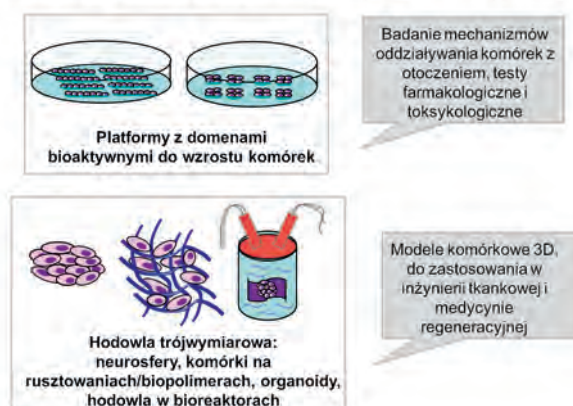
wanie bardzo silny wpływ mają czynniki środowiska, do jakiego komórki przeniesiemy, w tym: topografia otoczenia, rodzaj białek macierzy, czynniki wzrostowe. Wszystkie te czynniki tworzą rodzaj „niszy komórkowej”. „Biomimetyczne” mikrośrodowisko, tj takie, które przypomina naturalne warunki środowiska dla komórek macierzystych w hodowli *in vitro*, czyli warunki istniejące w niszy komórkowej. Do otrzymania warunków biomimetycznych stosuje się między innymi trójwymiarowe rusztowania biomateriałowe, które dostarczają strukturalną i logistyczną matrycę dla komórkowego różnicowania i funkcjonalnych oddziaływań. Biofunkcjonalizacja przy użyciu substancji białkowych, czynników wzrostowych ma za zadanie stworzyć z rusztowań 3D swoiste sztuczne nisze komórkowe. Zastosowanie bioreaktorów w systemie hodowli „biomimetycznej” zapewniają dodatkową kontrolę na poziomie molekularnym i fizyko-chemicznym, dostarczając związki rozpuszczalne, np. czynniki troficzne, białka sygnalizacyjne czy neurotransmitery (Ryc. 5).

Rusztowania 3D stosowane do transplantacji KM spełniają również funkcje ochronne osłaniając je przed reakcją immunologiczną dawcy, a jednocześnie dzięki biofunkcjonalizacji powierzchni umożliwią zwiększoną proliferację i migrację przeszczepianych komórek.

Na rodzaj i właściwości rusztowań do hodowli komórkowych wpływają zarówno materiały, których użyto do ich wytworzenia, technologie produkcji, jak i końcowa biofunkcjonalizacja ich powierzchni. Materiały do otrzymywania rusztowań 3D dzielimy na naturalne i syntetyczne. Do najczęściej stosowanych produktów naturalnych należą: elastyna, żelatyna,

wyższych t.j. PGA-PLA (PLGA); PGA-PCL, PLA-PCL czy PDO-PCL. Coraz częściej stosuje się również połączenia materiałów naturalnych i syntetycznych, co zakończyło się już sukcesem w badaniach dotyczących odbudowy naczyń krwionośnych, ale również badania nad odbudową tkanki nerwowej są obiecujące.

Bioinżynieria mikrośrodowiska komórek macierzystych



Ryc. 5. Komórki macierzyste mogą być hodowane w układach dwu- lub trójwymiarowych. Mikroplatformy z wzorem powierzchni biofunkcyjnych umożliwiają badanie mechanizmów oddziaływania komórek, podczas gdy układy trójwymiarowe hodowli na rusztowaniach i w bioreaktorach umożliwiają samoorganizację komórek w tkanki i organoidy.

Do materiałów, które powodują najmniejsze uszkodzenie tkanki w momencie ich wprowadzania należą niewątpliwie biomateriały wprowadzające tzw. 4-ty wymiar do systemu, umożliwiający zmiany i kontrolę systemu w czasie, czyli np. termo lub fotowrażliwość. Materiały te pod wpływem bodźca fizycznego, np.

zmiany temperatury otoczenia lub odpowiedniej długości fal, zmieniają swój stan skupienia, np. z płynnego na stały. Dzięki tym właściwościom podanie polimeru jest stosunkowo łatwe i nie powoduje powiększenia uszkodzenia narządu podczas jego podawania. Po wstrzyknięciu polimeru, pod wpływem temperatury otaczających tkanek polimer z postaci płynnej przechodzi w żel, dzięki czemu wypełnia szczelnie ubytek i stanowi dobre rusztowanie dla zawieszonych w nim komórek.

Do grupy tzw. „inteligentnych” materiałów należy również poly(N-isopropyl acrylamide) tworzący rodzaj membrany, na którą nasadzane są komórki. Po okresie, w którym komórki różnicują się w pożądanym kierunku, utworzą wzajemne połączenia oraz pokryją polimer, obniżana jest temperatura otoczenia poniżej tzw. temperatury przejścia. W nowych warunkach polimer „obkurcza się”, rozerwaniu ulegają połączenia pomiędzy polimerem i komórkami. Dzięki takim zmianom dochodzi do oddzielenia się warstwy komórek i możliwe jest ich przeniesienie do docelowego miejsca transplantacji.

Znane są techniki otrzymywania szkieletów biofunkcyjnych o zróżnicowanej budowie. Do produkcji szkieletów porowatych, np. hydrożeli, najczęściej stosuje się technikę separacji faz. W przedstawionej technice jedna z substancji jest substancją bazową, tworzącą w przyszłości szkielet, a druga substancją rozpuszczalną. Po zmieszaniu obu faz i przeprowadzeniu ich w postać stałą, stosując odpowiedni emulgator wyflukuje się tylko jedną z substancji, druga tworzy szkielet z pustymi przestrzeniami po substancji rozpuszczonej – tzw. porami. Pory powstające dzięki tej technice mają średnicę rzędu kilkudziesięciu mikrometrów i najczęściej są rozmieszczone losowo. Jednocześnie tworzą środowisko najbardziej przypominające topografią „naturalne nisze komórkowe”. Do rozdziału faz można również doprowadzić dzięki obniżeniu temperatury do temperatury krystalizacji jednej z faz. Po usunięciu kryształków otrzymujemy przestrzeń tworzącą pory. Dobierając materiał i rodzaj czynnika separującego (rozpuszczalność, temperatura, promieniowanie) tworzy się szkielety o różnych układach porów i różnej twardości, co upodabnia szkielet do docelowej tkanki, np. porowate szkielety o dużej twardości i zawartości soli wapnia służą jako rusztowania dla osteoblastów, podczas gdy hydrożele mogą być stosowane do regeneracji tkanki nerwowej. Przy prowadzeniu tzw. krystalizacji ukierunkowanej można otrzymać szkielety o porach mających postać równoległych biegnących rurek. Takie szkielety mogą być stosowane np. przy regeneracji nerwów obwodowych.

Aby rozkład porów mógł być bardziej uporządkowany i zaprojektowany powstały komputerowe metody szybkiego prototypowania i wytwarzania (CAD/CAM). Do metod tych należą: drukowanie 3D, stereo litografia czy utwardzanie płynnych warstw (*FDM*, ang. *fused deposition modeling*). W pierwszym etapie prototypowania, przy pomocy programów graficznych, projektuje się kształt przyszłego szkieletu, np. w oparciu o badanie TK mózgu odtwarza się w projekcji 3D kształt ubytku tkanki (np. po operacji lub urazie). W kolejnym etapie przy pomocy lasera podłączonego do komputera obrysowuje się pożądanego kształt na powierzchni fotopolimeru i przesuwając polimer warstwa po warstwie, zgodnie z projektem graficznym, otrzymuje się pożądanego kształt 3D. Niestety ograniczeniem tych metod jest możliwość zastosowania jedynie nielicznych tworzyw.

Oprócz rusztowań porowatych, drugą liczną grupę stanowią szkielety nanowłókniste. Szkielety te składają się z nanowłókien o rozmiarach od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów. Należą do nich rusztowania wytwarzane przy pomocy technik: elektrospiningu, samoorganizacji (ang. *self-assembly*) oraz nanotuby węglowe. Metoda elektrospinningu polega na przepuszczaniu przez kapilary o różnej średnicy wybranego polimeru. Pomiędzy końcówką kapilary a uzemiezione podłoże przykłada się napięcie, które powoduje osadzanie polimeru w postaci uszeregowanych, równoległych włókien. Kolejna metoda produkcji, tzw. metoda samoorganizacji, zbliżona jest do poprzedniej, ale pozbawiona czynnika ukierunkowującego, jakim jest pole elektryczne, co skutkuje powstaniem włókien o spiralnym, chaotycznym rozkładzie. Innego typu rusztowanie stanowią nanotuby/nanorurki węglowe. Są one wytwarzane różnymi metodami, np. przy zastosowaniu wyładowania łukowego, ablacji laserowej czy reakcji strącania chemicznego. Nanotuby węglowe są to alotropowe odmiany struktur węgla mające postać walców, o strukturze jedno- lub wielowarstwowej i średnicy od 1 do 100 nm. Obecnie coraz częściej stosowane są nanotuby grafenowe. Dzięki swoim właściwościom fizyko-chemicznym nanotuby wykazują niezwykłą wytrzymałość na rozciąganie i unikalne własności elektryczne. Nanorurki węglowe stają się również alternatywnym nośnikiem, posiadającym zdolność transportu dokomórkowego cząstek aktywnych biologicznie o działaniu terapeutycznym i diagnostycznym.

Najnowszą technikę stanowi biodrukowanie 3D. Drukarki 3D służą do „materializacji” cyfrowych modeli – tworzą trójwymiarowe obiekty z kropelek zastygającego polimeru. Jeżeli dodatkowo polimer będzie wzbogacony w zróżnicowane komórki, to

potencjalnie można byłoby po wydrukowaniu hodować pełen organ. W ten sposób powstały: pierwszy drukowany ząb, serce czy tchawica. Amerykańska firma Organovo, która jako pierwsza rozpoczęła produkcję ludzkich tkanek technologią 3D biodrukowania, tworzy naczynia krwionośne w ciągu kilku godzin.

Przy rozwoju opisywanych technik coraz bliżej jesteśmy osiągnięcia tzw. „idealnego” szkieletu, który miałby możliwość transplantacji bez dodatkowego uszkodzenia tkanki, dobrą adhezję nasiewanych komórek, pozytywny wpływ na przeżywalność oraz różnicowanie się transplantowanych komórek oraz zdolność do biodegradacji. W celu wytworzenia takich szkieletów dochodzi najczęściej do połączenia kilku przedstawionych technik. Ze względu na cechy fizyko-chemiczne zbliżone do tkanek, najczęściej bazą do tworzenia sztucznych nisz są hydrożele. W celu ukierunkowania neuralnego komórek w szkielet wkomponowuje się nanowłókna, które stanowią przewodnice dla zasiedlających i migrujących komórek. Ostatnim etapem jest biofunkcjonalizacja przy pomocy nadrukowywania powierzchni z zastosowaniem aktywnych mikromolekuł, celem ukierunkowanego różnicowania zasiedlających szkielet komórek.

Ze względu na łatwość podania i wstępne pozytywne wyniki, do zastosowania szkieletów 3D doszło najszybciej w chirurgii urazowej, a dokładnie w rekonstrukcji

uszkodzeń nerwów obwodowych. W latach 1990–2000 rozpoczęto pierwsze próby kliniczne z zastosowaniem polimerowych szkieletów, jako tzw. przewodników prowadzących. W pierwszych doświadczeniach zastosowano silikonowe lub kolagenowe tuby. Wykorzystanie szkieletów o różnych parametrach biofizycznych nie tylko umożliwiło odbudowę uszkodzenia, ale pozwoliło również kontrolować kierunek wzrostu pojedynczych włókien nerwowych. W kolejnych próbach wzbogacono szkielety polimerowe w składniki osocza pacjenta i komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, co znacznie przyspieszyło obserwowaną w elektromiografii (EMG) prawidłową regenerację włókien nerwowych. Na podstawie powyższych osiągnięć rekonstrukcyjnych rozpoczęto wstępne doświadczenia z zastosowaniem szkieletów kolagenowych opłaszczonych komórkami Schwanna. Zastosowanie komórek macierzystych znacząco przyspieszało proces regeneracji nerwów obwodowych. Zastosowanie biorusztowań do regeneracji OUN jest dopiero w fazie badań przedklinicznych, chociaż pierwsze, głośne w Polsce osiągnięcie naukowców z Wrocławia, którzy doprowadzili do skutecznej regeneracji rdzenia kręgowego było połączeniem terapii komórkowej z naturalnym rusztowaniem szkieletu otrzymanego z nerwu obwodowego.

Prof. dr hab. Leonora Bużańska, Marzena Zychowicz, Anna Sarnowska. Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. E-mail: buzanska@imdik.pan.pl.

BORNEO – NAUKA LATANIA

Józef Różański (Kraków)

Borneo, trzecia co do wielkości wyspa świata o łącznej powierzchni 743 330 km², położona jest w południowo-wschodniej Azji i wchodzi w skład Archipelagu Malajskiego (Ryc. 1). Wyspa ta jest pochodzenia wulkanicznego i ma zróżnicowaną rzeźbę terenu. Znajduje się na niej najwyższa góra Azji południowo-wschodniej, o nazwie Mount Kinabalu (Ryc. 2). Z punktu widzenia administracyjnego Borneo podzielone jest na trzy części. Około 1/3 powierzchni znajduje się na terenie państwa Malezyjskiego, blisko 2/3 wchodzi w skład Indonezji, natomiast niecały jeden procent powierzchni to sułtanat Brunei. Z przyrodniczego punktu widzenia najistotniejszy jest fakt, iż Borneo to jedno z najbogatszych pod względem bioróżnorodności miejsc na naszej planecie.

W skład flory lasu deszczowego porastającego Borneo (Ryc. 3), wchodzi około 15000 gatunków roślin okrytonasiennych. Spośród 3000 gatunków drzew,

267 to dipterokarpy. Ich nazwa pochodzi z Greki (*di* = dwa, *pteron* = skrzydło, *karpos* = owoc) i odnosi się



Ryc. 1. Azja południowo-wschodnia z uwzględnieniem zasięgu trzeciorzędowego Szelfu Sundajskiego oraz granicami krain zoogeograficznych: orientalnej i australijskiej (linie Wallace'a, Webera oraz Lydykera). J. Różański.