

PRZYŻYCIOWA OCENA FUNKCJI KOMÓREK MACIERZYSTYCH WSZCZEPIONYCH DO NARZĄDÓW O NISKIM STOPNIU SAMOODNAWIALNOŚCI*

IN SITU EVALUATION OF STEM CELL FUNCTION
GRAFTED TO ORGANS WITH 'LOW TURNOVER'

Małgorzata BIAŁAS, Maciej KURPISZ

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Poszczególne narządy człowieka mają własne rezerwy tkankowe, jakkolwiek istnieją narządy o dużym i małym potencjale samoodnawialności. W zainteresowaniu medycyny regeneracyjnej znajdują się zwłaszcza te drugie, reprezentowane przez mięsień sercowy, ośrodkowy układ nerwowy i trzustkę. W pracy przedstawiono próby określenia funkcjonowania komórek macierzystych w tych właśnie narządach i tkankach. Środowisko przedstawionych narządów różni się w aspekcie trwałości zasiedlenia przez komórki macierzyste; ten aspekt jest korzystny w przypadku organów ośrodkowego narządu nerwowego. W pozostałych stopień zasiedlenia komórek określany bardzo precyzyjnymi pomiarami jest raczej niski (np. dla regeneracji trzustki wykorzystuje się raczej miejsca ektopowe dla produkcji i wydzielania insuliny), jakkolwiek stale trwają próby udoskonalenia systemu podawania komórek do miejsca patologicznie zmienionego. Obecnie używane techniki obrazowania komórek, jak MRI (rezonans magnetyczny), SPECT (połączenie tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu z klasyczną tomografią komputerową) czy PET (wykorzystanie promieniowania rejestrowanego podczas anihilacji pozytronów) potrafią niezwykle precyzyjnie określić pozycję komórki i jej aktywność funkcjonalną. Każde z tych obecnie stosowanych narządów ma swoje silne i słabe strony wynikające z charakterystyki związków chemicznych, którymi się posługuje. Przykłady wykorzystywanych związków w poszczególnych próbach przedklinicznych i kontrolersje pomiarowe przedstawione są w niniejszej pracy.

Słowa kluczowe: obrazowanie, komórki macierzyste, organy o niskiej samoodnawialności.

Summary: Every human organ has its own capacity for self renewal due to progenitor cells of tissue reservoir. We can distinguish organs with 'high and low turnover' and for regenerative medicine the latter ones constitute the main target. These are represented by heart, central nervous system and pancreas. In this review, we focused on determination in situ of stem cell function in described organs and tissues. However, even in 'low turnover' systems the level of stem cell homing can be different. Surprisingly it is in favour of central nervous system. The remaining organs present low capacity for cell homing (instead of pancreas, where the ectopic sites can be used for insulin secretion and production) although the attempts to improve this critical issue are undergoing. Recent techniques of imaging as MRI (magnetic

*Praca finansowana z projektu MNiSzW nr N 403 065 31/3011 oraz projektu rozwojowego nr N R13 0065 06.

resonance imaging), SPECT (single photon emission computed tomography) or PET (positron emission tomography) have ability to precisely locate the cells within target organ and evaluate their functional (metabolic) activities. Beside of their sophistication, these instruments are based on chemical compounds that have their own characteristics, shortcomings and pitfalls. All of these are exemplified in this review together with specific examples of pre-clinical studies upon which the present controversies are outlined.

Key words: *in situ* imaging, stem cells, organs with 'low turnover'.

WSTĘP

Postęp w dziedzinie nauk biomedycznych niesie ze sobą nadzieję na pokonanie wielu nieuleczalnych do tej pory chorób. Jednym ze szczególnych obszarów badawczych są komórki macierzyste, sposoby ich pozyskiwania, modyfikacje genetyczne oraz zastosowania w terapii komórkowej oraz medycynie regeneracyjnej. Ze względu na swoje unikatowe właściwości, takie jak zdolność do różnicowania się w inne typy komórek, tkanek czy narządów oraz potencjalnie nieograniczony potencjał proliferacyjny, komórki macierzyste wykorzystywane w postaci przeszczepów auto- lub allogenicznym mogą mieć zastosowanie w regeneracji narządowej. Poza doбором rodzaju komórek (zarodkowe, somatyczne), ewentualnymi modyfikacjami genetycznymi oraz sposobem dostarczenia ich do uszkodzonej tkanki czy narządu zasługuje na uwagę ocena efektywności zastosowanej terapii. Algorytmy oceniające poprawę funkcjonowania narządu po zastosowaniu przeszczepu komórek macierzystych obejmują metody biochemiczne, molekularne, elektrofizjologiczne oraz szeroko rozumiane metody obrazowania. W niniejszej pracy zwrócimy uwagę na próby medycyny regeneracyjnej w odniesieniu do narządów o ograniczonej samoodnowie, tj. zwłaszcza wobec mięśnia sercowego, układu nerwowego i trzustki.

I. UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY

Choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną zgonów. Badania kliniczne z zastosowaniem komórek macierzystych w regeneracji mięśnia sercowego dotyczą zarówno ubytków rozsianych (kardiomiopatia pozaniedokrwienna z przyczyn pozapalnych lub niewiadomego pochodzenia), jak i ubytków o określonym zasięgu zmian (kardiomiopatia niedokrwienna (pozawałowa), ostry zawał serca). Według założeń terapii komórkowej, niewydolność lewej komory może zostać usunięta przez wprowadzenie innych komórek kurczliwych w obręb blizny pozawałowej lub w obszary, gdzie ściana komory uległa scieńczeniu. Jedną z najbardziej znaczących kwestii pozostaje dobór odpowiednich komórek macierzystych do regeneracji miokardium. Ze względu na łatwość pozyskiwania największe zainteresowanie badaczy skupiło się na autologicznych komórkach pochodzących ze szpiku kostnego. Najczęściej wykorzystywane były jednojądrzaste, niefrakcjonowane komórki szpiku – BMMNCs (ang. *Bone Marrow Mononuclear Cells*). W populacji wspomnianych

komórek macierzystych można wyróżnić trzy subpopulacje: komórki hematopoetyczne – HSC (ang. *Haematopoietic Stem Cells*), komórki progenitorowe śródbłónka – EPC (ang. *Endothelial Progenitor Cells*) oraz komórki mezenchymalne – MSC (ang. *Mesenchymal Stem Cells*). Oprócz wyżej przedstawionych ukierunkowanych komórek macierzystych, szpik kostny jest miejscem zasiedlenia także innych populacji komórkowych, definiowanych jako macierzyste. Spośród nich warto wskazać na komórki o szerszym spektrum różnicowania, takie jak: multipotencjalne komórki MAPC (ang. *Multipotent Adult Progenitor Cells*) o fenotypie CD44⁺, CD45⁻, nieobecnych antygenach HLA klasy I i II oraz c-kit⁻ [42], komórki MIAMI (ang. *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells*) z zachowanymi markerami pluripotencjalności Oct-4 i Rex-1 [11] oraz populację komórek VSELs (ang. *Very Small Embryonic-like Stem Cells*) zawierających oprócz wyżej wymienionych, także pluripotencjalne markery SSEA-1 i Nanog [28], stawiając te ostatnie w hierarchii o większym potencjale różnicowania niż pozostałe tu wymienione.

Początkowo uważano, że macierzyste komórki BMMNC ulegają transróżnicowaniu w kardiomiocyty. Jednak obecność markerów charakterystycznych dla kardiomiocytów (troponiny I oraz lekkiego łańcucha miozyny) okazała się być wynikiem ich fuzji z komórkami somatycznymi [3, 35]. W przypadku komórek szpikowych wykazano niski stopień ich retencji w 24 godziny po dowieńcowym podaniu do serca wynoszącym jedynie 2,6–11%, podczas gdy pozostała ich część lokalizowana była głównie w wątrobie lub śledzionie [30]. Nie bez znaczenia okazał się zatem sposób wprowadzania komórek do uszkodzonej tkanki. W badaniu, w którym komórki szpikowe podawane były pacjentom dowieńcowo po 55–75 minutach od zabiegu, tylko 1,3–2,6% komórek identyfikowano w obrębie miokardium. W przypadku systemowego podania dożylnego obserwowano wynik na granicy odczytu. Frakcjonowanie komórek szpikowych pod względem obecności antygenu CD34⁺ zwiększało retencję komórek do 14–39% przy podaniu dowieńcowym [25]. Podobne wyniki stwierdzano w badaniach przeprowadzanych na szczurach porównując trzy sposoby podania komórek: wewnątrzortalny, dożylny oraz bezpośrednio do miokardium. Najniższy procent retencji komórek w sercu obserwowano w przypadku systemowego podania dożylnego, wyższy w przypadku dowieńcowego, natomiast najwyższy przy bezpośrednim podaniu do miokardium [31]. W długotrwałych obserwacjach po wykonanych próbach klinicznych stwierdzono, że terapia z wykorzystaniem komórek szpikowych jest bezpieczna dla pacjentów. Podobnie wykazano bezpieczeństwo wprowadzania do miokardium innych typów dorosłych komórek macierzystych, jednocześnie wskazując na możliwość powstania procesu rozrostowego w miokardium (potworniaki) stosując nisko zróżnicowane zarodkowe komórki macierzyste (ESC) lub przeprogramowane genetycznie komórki pluripotencjalne – iPS, o czym obszernie omówiono w rozdziale dotyczącym prób klinicznych.

1. Potencjalna arytmogenność wszczepów komórkowych do miokardium

W przeciwieństwie do komórek szpikowych dobrze udokumentowane tworzenie nowych włókien mięśniowych w obrębie blizny pozawałowej po transplantacji

obserwowano dla prekursorowych komórek mięśniowych – mioblastów (tj. komórek rezerwy tkankowej mięśni szkieletowych). Jednak zamiast transróżnicowania zaobserwowano raczej fuzję mioblastów z kardiomiocytami (model myszy) [38], a zarazem brak funkcjonalnej integracji (elektrofizjologicznej) mioblastów z noworodkowymi kardiomiocytami szczurzymi w warunkach kokultury *in vitro* [1]. Pomimo to, w odróżnieniu od komórek szpikowych mioblasty wnosily do pozawałowego miokardium element kurczliwy, jednak z powodu braku ekspresji koneksyny 43 powodowały zjawisko arytmogenności na znacznie większą skalę niż jednojądrzaste komórki pochodzenia szpikowego. Stwierdzono *in vitro*, że nawracająca arytmia zależna była od proporcji mioblastów w stosunku do kardiomiocytów i nasilała się wraz ze wzrostem liczby mioblastów [1]. Badania jednojądrzastych komórek pochodzenia szpikowego wykazały znacznie niższą częstotliwość arytmii po ich wszczepieniu w stosunku do mioblastów. Zaobserwowano też zależność pomiędzy sposobem wprowadzania komórek do miokardium a częstotliwością obserwowanej arytmii. Bezpośrednie podanie komórek szpikowych (intramiokardialne) do mięśnia sercowego indukowało arytmie komorową około 7 dni po implantacji, podczas gdy podanie dowieńcowe nie powodowało zaburzeń [15]. Być może sugeruje to związek pomiędzy występowaniem arytmii, a predyspozycjami danych komórek do retencji po transplantacji. (Im wyższy odsetek komórek, które ulegają wszczepieniu, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia arytmii). Dalsze badania wskazywały na odwrotną zależność pomiędzy natężeniem odczynu zapalnego (pozawałowego) w miokardium na ekspresję koneksyny 43. Wydaje się, że zwłaszcza IL-1 β może powodować obniżenie ekspresji koneksyny, a pośrednio wywoływać arytmie. Na uwagę zasługują także doświadczenia przeprowadzone z samymi kardiomiocytami. Na przykład mysie kardiomiocyty płodowe podawano do uszkodzonego miokardium sondą wcześniej schłodzoną ciekłym azotem, a także do nieuszkodzonej części miokardium i stwierdzono brak elektrycznej integracji komórek w rejonie uszkodzonej tkanki oraz elektryczną integrację kardiomiocytów podanych do prawidłowo funkcjonującego miokardium [20]. Wyniki te sugerują wpływ obecności uszkodzonej tkanki na zjawisko zaburzeń integracji zgodnych fenotypowo kardiomiocytów. Tak więc arytmie mogą powstawać nie tylko w przypadku, gdy komórki macierzyste i ich pochodzenie różni się znacznie od fenotypu komórek narządu biernego, jakkolwiek wprowadzane genetycznie modyfikacje do implantowanych komórek macierzystych mogą skutecznie takim zjawiskom zapobiegać [17, 40], co szczegółowo wskazano w rozdziale dotyczącym modyfikacji genetycznych komórek macierzystych.

2. Przyżyciowe obrazowanie komórek macierzystych

Zastosowanie terapii komórkowej wymaga potwierdzenia skuteczności metody podania komórek, co można uzyskać wykorzystując dostępne systemy obrazowania. Na przykład rezonans magnetyczny – MRI (ang. *Magnetic Resonance Imaging*) jest metodą, która znajduje zastosowanie zarówno w próbach klinicznych, jak i w doświadczeniach naukowych. Umożliwia on ocenę morfologiczną i strukturalną serca oraz struktur okołosercowych, a także ocenę funkcjonalną (kurczliwość, frakcja

wyrzutowa). Natężenie wytwarzanego pola magnetycznego warunkuje możliwości obrazowania komórek. W diagnostyce klinicznej stosowane są urządzenia o natężeniu pola magnetycznego wynoszącym 0,1–2,0 Tesli. Badania przedkliniczne obejmujące ocenę modelu mysiego wymagają natężeń o zdecydowanie wyższej wartości (4,7–17,6 Tesli) [13, 22]. Analiza klasycznych parametrów czynnościowych daje informację dotyczącą funkcji badanego serca w ujęciu ogólnym (np. parametry hemodynamiczne w echokardiografii). Rozszerzenie oceny o techniki umożliwiające dokładną analizę kurczliwości oraz analizę obszaru blizny pozawałowej sprawiło, że MRI stał się szeroko rozpowszechniony w prowadzonych badaniach na modelu mysim. Opóźnione kontrastowanie uzyskuje się po podaniu paramagnetycznego środka kontrastującego na bazie związków gadolinu (64Gd), najczęściej jest to Gd-DTPA (*gadopentetate dimeglumine*). Zastosowanie tej techniki pozwala na określenie tzw. indeksu transmuralności, stanowiącego procentowy udział blizny pozawałowej w stosunku do całkowitej grubości ściany lewej komory oraz na ilościową ocenę regionalnej żywotności mięśnia sercowego [5]. Ponadto, miarodajną oceną przyżyciowej analizy wielkości zawału, w odniesieniu do tradycyjnych metod umożliwiających określanie obszaru zawału jest barwienie wyizolowanych serc za pomocą chlorku 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowego (TTC) [53]. Wprowadzono także modyfikowane postacie pochodnych gadolinu (EP-3533), kontrastu skierowanego bezpośrednio wobec mysiego kolagenu typu I. Taka postać związku kontrastowego utrzymuje się w obrębie blizny pozawałowej znacznie dłużej ($194,8 \pm 116,8$ min) niż Gd-DTPA ($25,5 \pm 4,2$ min), dając możliwość dłuższego okresu pomiarowego [21]. Wprowadzenie do komórek macierzystych polikationowych związków żelaza, a następnie podanie znakowanych komórek do mięśnia sercowego umożliwia lokalizację sygnału nawet do dwóch miesięcy po iniekcji. Metoda ta umożliwia badanie retencji przeszczepianych komórek oraz analizę ich migracji. Badania przeprowadzone na modelu szczurzym w 3 dni po podaniu znakowanych komórek wykazywały intensywny sygnał, który po 3 tygodniach od podania spadał do około 50–90% w stosunku do aktywności wyjściowej. Analiza histologiczna pozwoliła określić populację makrofagów w obrębie obszaru pozawałowego, która zawierała znaczące ilości jonów żelaza [50]. Wynik taki sugeruje, że należy ostrożnie stosować tlenki żelaza w obserwacjach długoterminowych, ze względu na wykazany brak specyficzności rejestrowanego sygnału.

Metoda pozytronowej tomografii emisyjnej – PET (ang. *Positron Emission Tomography*) wykorzystuje promieniowanie rejestrowane podczas anihilacji pozytronów zamiast zewnętrznego źródła promieniowania rentgenowskiego. Podwyższony metabolizm związków cukrowych w stanach patologicznych umożliwia wykorzystanie znakowanej izotopowo fluorodeoksyglukozy (^{18}F)-FDG). Rozpad izotopu powoduje emisję pozytronu, który następnie reaguje z elektronem w komórkach badanej tkanki. W wyniku anihilacji cząsteczek powstaje promieniowanie gamma rejestrowane przez detektory. Wykonano doświadczenie porównujące skuteczność metody MRI (komórki znakowane jonami żelaza) oraz PET (komórki znakowane poprzez transdukcję symporterem sodowo-jodowym). Po 24 godzinach od implantacji komórek uzyskiwa-

ny sygnał był intensywny w przypadku obu metod detekcji, po 3 dobach znacząco spadł w przypadku PET, a po 7 dniach był całkowicie niemierzalny. Odmienne zjawisko zanotowano dla komórek znakowanych żelazem, dla których sygnał był oznaczany niezmiennie w przeciągu całego doświadczenia (MRI). Badania histologiczne po 7 dniach potwierdziły obecność komórek CD68⁺, które na zasadzie fagocytozy przejęły cząsteczki żelaza pochodzące z wyznakowanych komórek, potwierdzając po raz kolejny spadek specyficzności odczytu wraz z upływem czasu [23]. Podsumowując, wykorzystanie techniki PET jest ograniczone ze względu na okres połowicznego rozpadu izotopu ($T_{1/2} \approx 110$ min), skracając możliwości czasowe wiarygodnej obserwacji znakowanych komórek w zasadzie do pierwszej doby po transplantacji [25]. Natomiast zastosowanie cząsteczek żelaza (MRI) wiąże się z ryzykiem fagocytozy znacznika przez makrofagi i może spowodować mylną interpretację uzyskanych wyników. Dlatego też obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się metody wykorzystujące bioluminescencję genów reporterowych. Wykorzystanie potrójnego reporterowego białka fuzyjnego, w skład którego wchodzi: lucyferaza, monomeryczne białko fluorescencji czerwonej oraz skrócona forma kinazy tymidynowej, umożliwiają odpowiednio: obserwację przyżyciowej bioluminescencji wyznakowanych komórek w modelach małych zwierząt doświadczalnych, obrazowanie pojedynczej komórki macierzystej za pomocą technik fluorescencyjnych (w tym sortowania komórek) oraz wykorzystania techniki PET [7]. Zastosowanie tych technik umożliwia precyzyjną identyfikację uzyskanej populacji komórek, a następnie jej wykorzystanie (wprowadzenie) w regeneracji narządowej z jednoczesnym umożliwieniem rozbudowy systemu obrazowania dla oceny migracji i zasiedlania komórek.

II. UKŁAD NERWOWY

1. Uwagi wstępne

Uszkodzenie centralnego układu nerwowego, obejmujące mózg oraz rdzeń kręgowy jest zwykle nieodwracalne, a uszkodzenie ciągłości nerwów rdzenia kręgowego wpływa na ograniczenie (częściowe lub całkowite) sprawności czuciowej oraz ruchowej. W przeciwieństwie do innych tkanek (krew, nabłonek jelita, skóra), w których występuje intensywna regeneracja przy wykorzystaniu rezydencjalnych populacji komórek macierzystych, układ nerwowy (ze względu na wysoko wyspecjalizowaną strukturę) wykazuje znikomy potencjał regeneracyjny. Strategia terapii komórkowej w regeneracji np. uszkodzonego rdzenia kręgowego obejmuje wytworzenie nowych połączeń w uszkodzonej tkance nerwowej i ponowną stabilizację komunikacji pomiędzy centralnym a obwodowym układem nerwowym [41]. Dodatkowo, komórki macierzyste mogą zostać wykorzystane jako potencjalne źródło czynników wzrostu oraz substancji neuroprotektoryjnych wspomagających regenerację tkanki nerwowej. Ze względu na właściwości wielokierunkowego różnicowania największe zainteresowanie skupiono początkowo na zarodkowych komórkach macierzystych. Wykazano, że uzyskane z zarodkowych komórek macierzystych neurony skutecznie zasiedlały rdzeń kręgowy, rozprzestrzeniając aksony oraz formując synapsy w obrębie obwodowych włókien

mięśniowych [12]. Z ludzkich macierzystych komórek zarodkowych można uzyskać multipotentjalne prekursorowe komórki nerwowe, motoneurony oraz komórki progenitorowe oligodendrocytów, co potwierdza możliwość różnicowania *in vitro* komórek ESC w kierunku różnych populacji komórek nerwowych [8]. Dużą nadzieję upatruje się także w endogennych macierzystych komórkach nerwowych (rezerwie tkankowej), których występowanie potwierdzono w obrębie centralnego układu nerwowego wyższych ssaków oraz w rozwijającym się i dojrzałym mózgu ludzkim, rdzeniu kręgowym oraz nerwie wzrokowym [8]. Wykonane badania wykazują zadziwiająco wysoki procent zasiedlania przeszczepianych komórek macierzystych do układu nerwowego (100%) oraz terminalne różnicowanie w kierunku mielinizujących oligodendrocytów oraz neuronów tworzących synapsy w obrębie istoty szarej i białej rdzenia kręgowego [26]. Macierzyste komórki rezerwy tkankowej organizmów dorosłych w przeciwieństwie do populacji pochodzenia zarodkowego wykazują niższą częstotliwość proliferacji, czyniąc je potencjalnie mniej atrakcyjnym źródłem w przyszłych próbach klinicznych [8].

W badaniach klinicznych wykorzystano do tej pory ludzkie komórki glejowe, komórki węchowe, komórki Schwanna, komórki krwi pępowinowej oraz mezenchymalne komórki zrębu pochodzące ze szpiku kostnego – MSC (ang. *Mesenchymal Stromal Cells*) [37]. Wszystkie wymienione badania należały do prób nierandomizowanych. Na przykład, podanie komórek szpikowych (wraz z podaniem GM-SCF, tj. czynnika stymulującego formowanie kolonii granulocytów oraz makrofagów) wykazało poprawę u wszystkich pacjentów do 14. dnia po urazie rdzenia kręgowego, a w 8 tygodni po urazie tylko u około 30% osobników według skali AIS (ang. *American Spinal Injury Association Impairment Scale*). Nie wykazano poprawy w przypadku urazu chronicznego powyżej 8. tygodnia od uszkodzenia rdzenia kręgowego [55]. Subpopulacja komórek szpikowych, do jakiej niewątpliwie należą mezenchymalne komórki zrębu, umożliwia w warunkach *in vitro* uzyskanie komórek o morfologii charakterystycznej dla neuronów zarówno w przypadku komórek ludzkich, jak i szczurzych. Jednakże po podaniu do krwiobiegu komórek szpikowych wykazujących ekspresję białka GFP stwierdzono brak ich różnicowania w kierunku komórek nerwowych, glejowych czy endotelialnych [37]. Podanie komórek MSC (pochodzących z transgenicznych myszy charakteryzujących się ekspresją białka GFP) w obręb uszkodzonego rdzenia kręgowego u szczura umożliwiło w warunkach *in vivo* obserwację migracji komórek do 4. tygodnia po transplantacji, wykazując jednocześnie, iż część z podanych komórek miała markery komórek neuronalnych oraz astrocytów [54].

2. Przyżyciowe obrazowanie komórek macierzystych

Podobnie jak w przypadku terapii komórkowej dotyczącej serca, w neuroregeneracji stosowana jest powszechnie technika MRI wykorzystująca znakowanie komórek nanocząsteczkami tlenków żelaza. Systemowe dożylnie podawanie znakowanych komórek lub bezpośrednie ich podanie do tkanki mózgu umożliwia śledzenie ich migracji do miejsca wykazującego zmiany patologiczne, retencję nawet nieznacz-

nej liczby komórek oraz ich różnicowanie (głównie w kierunku neuronów, w modelu szczurzym) [47]. Wykazano poprawę nie tylko w przypadku „świeżych” uszkodzeń rdzenia, ale także w przypadku zmian odległych. Bezpośrednie podanie komórek MSC do rdzenia kręgowego po 3 miesiącach od wystąpienia urazu umożliwiło obserwację efektu terapeutycznego już w 4 tygodnie po implantacji, który utrzymywał się także po roku od wykonanego zabiegu [56].

W przypadku ludzkich komórek MSC (podanie dożylnie) zaobserwowano raczej różnicowanie się w kierunku oligodendrocytów, ale nie komórek neuronowych [37]. Stwierdzany efekt terapeutyczny może być przypisany wydzielanym przez komórki MSC czynnikom neurotroficznym i/lub cytokinom, co tłumaczyłoby znaczącą poprawę kliniczną przy jednoczesnym, niskim stopniu retencji przeszczepianych komórek (11-tygodniowy okres obserwacji) [24].

Technika MRI pozwala także na ocenę skuteczności stosowania komórek MSC, ESC oraz szpikowych komórek CD34⁺ znakowanymi cząsteczkami magnetycznymi w regeneracji uszkodzonej kory mózgowej oraz rdzenia kręgowego (model szczurzy). Niezależnie od drogi podania komórek, po tygodniu obserwowano ich migrację w obrębie uszkodzenia, a silny sygnał odczytywany był także w 30 dni po transplantacji [46]. Ponadto ta sama grupa badaczy dokonała porównania znakowania komórek MSC nanocząsteczkami tlenku żelaza oraz związanymi z polikationami superparamagnetycznymi nanocząsteczkami tlenku żelaza (PC-SPIO), wskazując na te drugie jako bardziej efektywne w znakowaniu komórek i niewpływające na ich żywotność [45].

Komórki macierzyste znalazły także zastosowanie w leczeniu choroby Parkinsona polegającej na występowaniu zmian zwyrodnieniowych w obrębie populacji neuronów produkujących dopaminę. Brak wspomnianego przekąźnika prowadzi do zaburzeń funkcji motorycznej objawiającej się charakterystycznym drżeniem spoczynkowym oraz trudnościami w poruszaniu się pacjentów. Neurony uzyskane w modelu mysim z zarodkowych komórek macierzystych z zaindukowaną chorobą Parkinsona, przez uszkodzenie prądkowia wskutek użycia 6-hydroksydopaminy (toksyczny związek dla neuronów dopaminergicznych), wykazywały retencję po 32 tygodniach od podania. Funkcjonalność podanych neuronów potwierdzona została przy wykorzystaniu techniki PET, której zastosowanie pozwoliło określić aktywność presynaptyczną transporterów dopaminergicznych w obszarze przeszczepu oraz aktywność receptorów postsynaptycznych w obrębie ciała prądkowanego [39]. Podobne badania (model szczurzy) wykazały obecność podanych komórek w rok po implantacji. Poza poprawą funkcji neuronów dopaminergicznych w obrębie uszkodzonej tkanki, na uwagę zasługuje brak rozwijania się zmian potworniakowych, co jest zjawiskiem częstym i niebezpiecznym w przypadku stosowania terapii z zastosowaniem zarodkowych komórek macierzystych [16].

W leczeniu choroby Parkinsona wykorzystano także komórki galarety Whartona pochodzące z macierzy ludzkiego sznura pępowinowego – hUCMSC (ang. *Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells*). Wyniki uzyskane w modelu szczurzym wykazały znaczącą produkcję neurotroficznego czynnika – GDNF (ang. *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*) dla neuronów dopaminergicznych oraz poprawę stanu leczonych zwierząt [52]. Komórki te, ze względu na stosunkową łatwość izolacji,

negatywny fenotyp dla markerów CD34 i CD45, znaczący potencjał proliferacyjny oraz możliwość klonowania i modyfikacji genetycznych, znajdują się w obszarze zainteresowania wielu grup zajmujących się chorobami neurodegeneracyjnymi [6].

W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono badania przedkliniczne dotyczące wpływu implantowanych prekursorowych komórek neuronalnych zróżnicowanych z zarodkowych mysich komórek macierzystych na regenerację uszkodzonego jądra podstawnego Meynerta, stanowiącego część układu cholinergicznego mózgowia, którego uszkodzenie jest charakterystyczne dla choroby Alzheimera. Po podaniu komórek macierzystych stwierdzono poprawę pamięci dzięki obecnym w dużej liczbie neuronom cholinergicznym zasiedlającym uszkodzoną tkankę [51]. Interesujące badania przeprowadzone zostały również w próbach przedklinicznych terapii stwardnienia rozsianego, tj. choroby o podłożu autoimmunologicznym, polegającej na niszczeniu komórek tkanki nerwowej gospodarza przez jego własny system odpornościowy. Podanie prekursorowych komórek nerwowych uzyskanych z zarodkowych komórek macierzystych spowodowało efekt immunosupresyjny wobec układu odpornościowego, działając jednocześnie neuroprotekcynie na komórki gospodarza [2].

Podobnie jak w przypadku regeneracji mięśnia sercowego, technika MRI wykorzystująca komórki znakowane tlenkami żelaza, jest techniką mało specyficzną, wymagającą potwierdzenia metodami histopatologicznymi i wydaje się być mało przydatna w analizie fizjologii czy procesach rozwojowych danego narządu. Dlatego też na potrzeby neuroregeneracji wprowadza się systemy oparte na bioluminescencji. Początkowo, wykorzystując obrazowanie za pomocą bioluminescencji, przy zastosowaniu podwójnego białka fuzyjnego lucyferazy wraz z białkiem GFP, obserwowano przeżywalność komórek, analizowano ich immunogenność, migrację oraz zagrożenie procesem nowotworzenia podanych zarodkowych komórek macierzystych [44]. Badania te pozwoliły wykazać, iż zarodkowe komórki macierzyste demonstrowały ograniczoną przeżywalność w przypadku ich implantowania do organizmów immunokompetentnych (implantacja allogeniczna). Ponowne podanie komórek do tego samego organizmu powodowało intensywną apoptozę sugerując rozwój specyficznej odpowiedzi immunologicznej wobec macierzystych komórek dawcy. Ponadto obserwowano wzmożenie odpowiedzi immunologicznej zarówno typu humoralnego, jak i komórkowego oraz udział limfocytów CD4⁺ T jako ważnych mediatorów w reakcji odrzucania przeszczepu [44].

Zainicjowane modyfikacje genetyczne uzyskiwanych z zarodkowych komórek macierzystych komórek nerwowych mających ekspresję białka fuzyjnego zawierającego lucyferazę oraz białko GFP. Podanie takich komórek do uszkodzonej tkanki mózgowej (udar mózgu) oraz ich obserwacja przez kolejne 2 miesiące (przy wykorzystaniu technik MRI oraz bioluminescencji) pozwoliły stwierdzić, iż różnicują się one w kierunku neuronów (oligodendrocytów) podlegających procesowi mielinizacji w miejscu udaru oraz w kierunku astrocytów. Zastosowanie znakowania komórek przy użyciu nanocząsteczek tlenku żelaza umożliwiło obrazowanie z wysoką czułością zarówno procesu zasiedlania przeszczepionych komórek, jak i zmian anatomicznych w obrębie objętej udarem tkanki mózgowej. Zastosowanie systemu reporterowego

opartego na stabilnie transfekowanych komórkach genem dla lucyferazy daje pewność co do specyficzności uzyskanego obrazu, ciągłości emisji oraz natężenia sygnału, bez zagrożenia rozcieńczenia intensywności sygnału jako konsekwencji naturalnych podziałów komórkowych [9].

Podsumowując do tej pory wykonane badania wykorzystujące różne typy komórek macierzystych (ESC, hNSC, MSC) można potwierdzić pewną skuteczność prób terapii komórkowej w aspekcie neuroregeneracji. Jednakże mechanizm obserwowanej poprawy jest nadal niewyjaśniony, a fakt, iż zachodzi ona przy zastosowaniu bardzo różnych typów komórek, może wskazywać na ich parakrynnny charakter [41].

III. UKŁAD TRAWIENNO-WYDZIELNICZY TRZUSTKI

Terapia z wykorzystaniem komórek macierzystych zyskuje duże zainteresowanie w leczeniu cukrzycy. Uszkodzenie produkujących insulinę komórek β wysp Langerhansa, znajdujących się w części wewnątrzwydzielniczej trzustki, może nastąpić w wyniku reakcji autoimmunologicznych (cukrzyca typu I), zaburzeń w wydzielaniu insuliny przez komórki β oraz działaniu samego hormonu (cukrzyca typu II). Największe nadzieje w terapii komórkowej upatruje się w wykorzystaniu zarodkowych komórek macierzystych, jakkolwiek doświadczenia w warunkach *in vitro* nie wykazały do tej pory możliwości uzyskania w pełni funkcjonalnej populacji komórek β wydzielających insulinę w postaci fizjologicznej odpowiedzi na glukozę [19]. Komórki produkują hormon, lecz w znacznie niższym zakresie niż w warunkach naturalnych. Obserwowany jest też brak wzrostu produkcji insuliny w odpowiedzi na zwiększające się stężenie glukozy, jak ma to miejsce w przypadku prawidłowo funkcjonującej trzustki. Poznanie mechanizmów prowadzących do powstawania trzustki w trakcie embrio-organogenezy pozwoliły opracować protokół pozwalający w warunkach *in vitro* na otrzymanie komórek odpowiadających komórkom β [10, 29]. Pierwszym etapem było uzyskanie komórek należących do endodermalnego listka zarodkowego w wyniku stymulacji zarodkowych komórek macierzystych aktywiną A oraz czynnikiem Wnt3a. Stymulacja przy pomocy FGF-10 oraz CYC (KAAD-cyklopamina) umożliwiła rozwój prajelita. W etapie trzecim komórki poddane zostały ekspozycji na kwas retinowy, co przyczyniło się do rozwoju tylnej części prajelita, a w konsekwencji rozwoju endodermy trzustkowej oraz prekursorowych komórek endokrynnych. Po około 15 dniach komórki endokrynnie produkowały hormony: insulinę, glukagon, somatostatynę, polipeptyd trzustkowy oraz gherlinę. Funkcjonalność uzyskanych komórek została potwierdzona przez implantację komórek macierzystych do trzustki uszkodzonej przez streptozoocynę. Stwierdzono, że stymulacja glukozą powoduje produkcję ludzkiego peptydu C potwierdzając funkcjonalność produkowanego białka [29]. Uzyskane komórki odpowiadały raczej charakterystyce niedojrzałych komórek trzustki, ponieważ wydelały stosunkowo niewielkie ilości insuliny, charakteryzując się niskim stopniem odpowiedzi na stymulację glukozą i produkując jednocześnie (niespecyficznie) różne rodzaje hormonów [19]. Nie udało

się do tej pory uzyskać w pełni funkcjonalnych odpowiedników dojrzałych komórek β , być może ze względu na brak w warunkach *in vitro* interakcji pomiędzy komórkami mezenchymalnymi oraz epitelialnymi, jakie występują podczas organogenezy trzustki *in vivo*. Być może niezbędne okazały się sygnały pochodzenia ektodermalnego lub mezodermalnego, których opisana powyżej metoda jest pozbawiona. Monitorowanie zasiedlania komórek (po implantacji) oraz produkcji insuliny może zostać przeprowadzone przy wykorzystaniu nowoczesnych metod polegających na uzyskaniu komórek produkujących insulinę, w której peptyd C zawiera sekwencję białka zielonej fluorescencji [4].

Podobne badania wykorzystujące mysie zarodkowe komórki macierzyste, u których występowała ekspresja białka GFP (pod kontrolą promotora genu insuliny), umożliwiły wizualizację komórek β po ich transplantacji. Komórki te wprowadzone do torebki nerkowej formowały zmiany nowotworowe typu potworniaka. Tkanka nowotworowa zawierała komórki charakteryzujące się ekspresją białka GFP, występujące w skupiskach o strukturze sznurów, przypominających budowę trzustkę w rozwoju embrionalnym. Rozwijająca się tkanka zawierała ponadto komórki α produkujące glukagon oraz komórki gruczołowe produkujące amylazę [33].

Przeprowadzono także doświadczenia z uzyskaniem komórek trzustkowych przy wykorzystaniu techniki klonowania terapeutycznego, polegającej na wprowadzeniu jądra somatycznej komórki do zarodkowej mysiej komórki macierzystej pozbawionej jądra. Zmodyfikowane komórki poddawano chemicznemu różnicowaniu, analogicznemu jak w przypadku różnicowania z komórek ESC. Transplantacja prekursorowych komórek macierzystych do torebki nerkowej skutkowała znacznym obniżeniem poziomu glukozy we krwi w grupie myszy badanych w porównaniu z grupą kontrolną. Usunięcie wszczepu komórkowego powodowało wzrost stężenia glukozy we krwi do wartości obserwowanej przed podaniem [27]. Nie tylko zarodkowe komórki macierzyste mogą być wykorzystywane jako potencjalne źródło uzyskiwania komórek β trzustki. Najnowsze badania donoszą na przykład o komórkach pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej powieki. Stymulacja chemiczna tych komórek (amid kwasu nikotynowego, aktywina, i/lub peptyd glukagonopodobny-1 – GLP-1, ang. *Glucagon-like Peptide-1*) doprowadziła do wyosobnienia populacji produkujących insulinę. Implantacja tych komórek do torebki nerkowej u myszy z uszkodzoną trzustką przez podanie streptozoocyny, spowodowała normalizację hyperglikemii u około 50% myszy. Usunięcie wszczepu komórkowego wywołało, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, wzrost stężenia poziomu glukozy we krwi [32]. Indukcja pluripotentjalnych ludzkich fibroblastów skóry (tzw. iPS) umożliwiła uzyskanie populacji komórek, które pod wpływem stymulacji chemicznej zostały przekształcone w komórki produkujące insulinę. Produkcja insuliny była ponadto zależna od stymulacji glukozą. Pluripotencja uzyskanych komórek iPS była potwierdzona przez uformowanie u myszy zmian nowotworowych po transplantacji pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych [49].

Obrazowanie przyżyciowe komórek β trzustki może być realizowane za pomocą takich systemów, jak PET. Biomarker komórek β trzustki, jakim jest transporter

amin katecholowych umiejscowiony w błonie pęcherzyków cytoplazmatycznych – VMAT2 (ang. *Vesicular Monoamine Transporter type 2*), w połączeniu z radioaktywnie wyznakowanym ligandem [(11)C] DTBZ (dihydrotetrabenazyna) umożliwia wizualizację komórek β trzustki przy wykorzystaniu pozytonowej tomografii emisyjnej [14]. Przydatność tej metody została potwierdzona w modelu szczurzym [43], lecz badania na przedstawicielach naczelnych nie wykazały akumulacji znacznika w obrębie trzustki [36]. Wizualizacja komórek β może zostać także przeprowadzona przez podanie wyznakowanego radioizotopem monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciw tym komórkom oraz obserwację przy użyciu technik nuklearnych umiejscowienia wyznakowanych komórek. Metoda ta została zweryfikowana przez porównanie intensywności sygnału u szczurów z uszkodzonymi komórkami trzustki w wyniku podania streptozoocyny z intensywnością sygnału u zwierząt zdrowych [34].

Szeroko wykorzystywany jest także rezonans magnetyczny. Wzmocnienie sygnału można tu uzyskać przy wykorzystaniu zjawiska akumulacji jonów manganu (Mn^{2+}) w komórkach β trzustki, co jest zjawiskiem proporcjonalnym w stosunku do stężenia glukozy. Metoda ta pozwoliła określić liczbę komórek β w hodowli komórkowej *in vitro* oraz w przypadku izolowanych wysp trzustkowych [18].

Z kolei stabilna transfekcja komórek należących do linii komórkowej β trzustki konstrukcją genową opartą na wirusie opryszczki typu I, kinazie tymidynowej oraz białku GFP umożliwiła wizualizację implantu do torebki nerkowej za pomocą techniki SPECT/CT (ang. *Single Photon Emission Computed Tomography*) (połączenie tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu wraz z klasyczną tomografią komputerową) [48].

PODSUMOWANIE

Poprawa funkcjonalności narządu/tkanki z wykorzystywanymi komórkami macierzystymi musi znacząco przewyższać potencjalne skutki uboczne (zmiany nowotworowe, nietolerancja immunologiczna w przypadku przeszczepów allogeniczných). Dlatego też testy funkcjonalne stosowane zwłaszcza na etapie badań przedklinicznych są niezwykle istotne. Terapia narządowa komórkami macierzystymi na etapie prowadzonych badań klinicznych wymaga zastosowania słabo inwazyjnych metod, precyzyjnie dostarczających czynnik terapeutyczny w miejsce docelowe jednocześnie z maksymalnie wysokim poczuciem stanu bezpieczeństwa u pacjenta i obejmowaniem jak najszerszej dostępnych parametrów monitorujących funkcję regenerowanego narządu.

LITERATURA

- [1] ABRAHAM MR, HENRIKSON CA, TUNG L, CHANG MG, AON M, XUE T, LI RA, O' ROURKE B, MARBÁN E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiactransplantation. *Circ Res* 2005; **97**: 159–167.

- [2] AHARONOWIZ M, EINSTEIN O, FAINSTEIN N, LASSMANN H, REUBINOFF B, BEN-HURT T. Neuroprotective effect of transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursors in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2008; **3**: e3145.
- [3] BALSAM LB, WAGERS AJ, CHRISTENSEN JL, KOFIDIS T, WEISSMAN IL, ROBBINS RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; **428**: 668–673.
- [4] BEN-YEHU DAHA, WHITE C, NAVARA CS, CASTRO CA, IZE-LUDLOW D, SHAFFER B, SUKHWANI M, MATHEWS CE, CHAILLET JR, WITCHEL SF. Evaluating protocols for embryonic stem cell differentiation into insulin-secreting beta-cells using insulin II-GFP as a specific and noninvasive reporter. *Cloning Stem Cells* 2009; **11**: 245–257.
- [5] BIELKAA, MISZALSKI-JAMKA T, GŁOWACKI J, JARSKI P, KALARUS Z. Przydatność oceny żywotności mięśnia sercowego przed rewaskularyzacją u chorego ze ścięciem mięśnia sercowego lewej komory za pomocą kardiologicznego rezonansu magnetycznego – opis przypadku. *Kardiochir Torakochir Pol* 2009; **6**: 198–201.
- [6] CAO FJ, FENG SQ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chin Med J (Engl)* 2009; **122**: 225–231.
- [7] CAO F, LIN S, XIE X, RAY P, PATEL M, ZHANG X, DRUKKER M, DYLLA SJ, CONNOLLY AJ, CHEN X, WEISSMAN IL, GAMBHIR SS, WU JC. *In vivo* visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 2006; **113**: 1005–1014.
- [8] COUTTS M, KEIRSTEAD HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008; **209**: 368–377.
- [9] DAADI MM, LI Z, ARAC A, GRUETER BA, SOFILOS M, MALENKA RC, WU JC, STEINBERG GK. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol Ther* 2009; **17**: 1282–1291.
- [10] D'AMOUR KA, BANG AG, ELIAZER S, KELLY OG, AGULNICK AD, SMART NG, MOORMAN MA, KROON E, CARPENTER MK, BAETGE EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; **24**: 1392–1401.
- [11] D'IPPOLITO G, DIABIRA S, HOWARD GA, MENEI P, ROOS BA, SCHILLER PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; **117**(Pt 14): 2971–2981.
- [12] DESHPANDE DM, KIM YS, MARTINEZ T, CARMEN J, DIKE S, SHATS I, RUBIN LL, DRUMMOND J, KRISHNAN C, HOKE A, MARAGAKIS N, SHEFNER J, ROTHSTEIN JD, KERR DA. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol* 2006; **60**: 32–44.
- [13] EPSTEIN FH. MR in mouse models of cardiac disease. *NMR Biomed* 2007; **20**: 238–255.
- [14] FREEBY M, GOLAND R, ICHISE M, MAFFEIA A, LEIBEL R, HARRIS P. VMAT2 quantitation by PET as a biomarker for beta-cell mass in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10** (Suppl 4): 98–108.
- [15] FUKUSHIMA S, VARELA-CARVERA A, COPPEN SR, YAMAHARA K, FELKIN LE, LEE J, BARTON PJ, TERRACCIANO CM, YACIOUB MH, SUZUKI K. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 2007; **115**: 2254–2261.
- [16] GEETA R, RAMNATH RL, RAO HS, CHANDRA V. One year survival and significant reversal of motor deficits in parkinsonian rats transplanted with hESC derived dopaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **373**: 258–264.
- [17] GEPSTEIN L. Electrophysiologic implications of myocardial stem cell therapies. *Heart Rhythm* 2008; **5**(6 Suppl): S48–52.
- [18] GIMI B, LEONI L, OBERHOLZER J, BRAUN M, AVILA J, WANG Y, DESAI T, PHILIPSON LH, MAGIN RL, ROMAN BB. Functional MR microimaging of pancreatic beta-cell activation. *Cell Transplant* 2006; **15**: 195–203.
- [19] GUO T, HEBROK M. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy. *Endocr Rev* 2009; **30**: 214–227.
- [20] HALBACH M, PFANNKUCHE K, PILLEKAMP F, ZIOMKA A, HANNES T, REPPLE M, HESCHLER J, MÜLLER-EHMSSEN J. Electrophysiological maturation and integration of murine fetal cardiomyocytes after transplantation. *Circ Res* 2007; **101**: 484–492.
- [21] HELM PA, CARAVAN P, FRENCH BA, JACQUES V, SHEN L, XU Y, BEYERS RJ, ROY RJ, KRAMER CM, EPSTEIN FH. Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology* 2008; **247**: 788–796.

- [22] HEROLD V, MÖRCHEL P, FABER C, ROMMEL E, HAASE A, JAKOB PM. *In vivo* quantitative three-dimensional motion mapping of the murine myocardium with PC-MRI at 17.6 T. *Magn Reson Med* 2006; **55**: 1058–1064.
- [23] HIGUCHI T, ANTON M, DUMLER K, SEIDL S, PELISEK J, SARAŠTE A, WELLING A, HOFMANN F, OOSTENDORP RA, GANSBACHER B, NEKOLLA SG, BENDEL FM, BOTNAR RM, SCHWAIGER M. Combined Reporter Gene PET and Iron Oxide MRI for Monitoring Survival and Localization of Transplanted Cells in the Rat Heart. *J Nucl Med* 2009; **50**: 1088–1094.
- [24] HIMES BT, NEUHUBER B, COLEMAN C, KUSHNER R, SWANGER SA, KOPEN GC, WAGNER J, SHUMSKY JS, FISCHER I. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 2006; **20**: 278–296.
- [25] HOFMANN M, WOLLERT KC, MEYER GP, MENKE A, ARSENIJEV L, HERTENSTEIN B, GANSER A, KNAPP WH, DREXLER H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; **111**: 2198–2202.
- [26] HOOSHMAND MJ, SONTAG CJ, UCHIDA N, TAMAKI S, ANDERSON AJ, CUMMINGS BJ. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One* 2009; **4**: e5871.
- [27] JIANG W, BAI Z, ZHANG D, SHI Y, YONG J, CHEN S, DING M, DENG H. Differentiation of mouse nuclear transfer embryonic stem cells into functional pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2008; **51**: 1671–1679.
- [28] KUCIA M, RECAR, CAMPBELL FR, ZUBA-SURMA E, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857–869.
- [29] KROON E, MARTINSON LA, KADOYA K, BANG AG, KELLY OG, ELIAZER S, YOUNG H, RICHARDSON M, SMART NG, CUNNINGHAM J, AGULNICK AD, D'AMOUR KA, CARPENTER MK, BAETGE EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 443–452.
- [30] KURPISZ M, CZEPCZYŃSKI R, GRYGIELSKA B, MAJEWSKI M, FISZER D, JERZYKOWSKA O, SOWIŃSKI J, SIMINIAK T. Bone marrow stem cell imaging after intracoronary administration. *Int J Cardiol* 2007; **121**: 194–195.
- [31] LI SH, LAI TY, SUN Z, HAN M, MORIYAMA E, WILSON B, FAZEL S, WEISEL RD, YAU T, WU JC, LI RK. Tracking cardiac engraftment and distribution of implanted bone marrow cells: Comparing intra-aortic, intravenous, and intramyocardial delivery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; **137**: 1225–1233.e1.
- [32] MI KANG H, KIM J, PARK S, KIM J, KIM H, SIK KIM K, JIG LEE E, IG SEO S, GOO KANG S, LEE JE, LIM H. Insulin-Secreting Cells from Human Eyelid-Derived Stem Cells Alleviate Type I Diabetes in Immunocompetent Mice. *Stem Cells* 2009; **27**: 1999–2008.
- [33] MILEWSKI WM, TEMPLE KA, WESSELSCHMIDT RL, HARA M. Generation of embryonic stem cells from mouse insulin I promoter-green fluorescent protein transgenic mice and characterization in a teratoma model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; **45**: 1–5.
- [34] MOORE A. Advances in beta-cell imaging. *Eur J Radiol* 2009; **70**: 254–257.
- [35] MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, RUBART M, PASUMARTHI KB, VIRAG JI, BARTELMER SH, POPPA V, BRADFORD G, DOWELL JD, WILLIAMS DA, FIELD LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**: 664–668.
- [36] MURTHY R, HARRIS P, SIMPSON N, VAN HEERTUM R, LEIBEL R, MANN JJ, PARSEY R. Whole body [¹¹C]-dihydrotetrabenazine imaging of baboons: biodistribution and human radiation dosimetry estimates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; **35**: 790–797.
- [37] PARR AM, TATOR CH, KEATING A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 2007; **40**: 609–619.
- [38] REINECKE H, MINAMI E, POPPA V, MURRY CE. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ Res* 2004; **94**: e56–60.
- [39] RODRÍGUEZ-GÓMEZ JA, LU JQ, VELASCO I, RIVERA S, ZOGHBI SS, LIOW JS, MUSACHIO JL, CHIN FT, TOYAMA H, SEIDEL J, GREEN MV, THANOS PK, ICHISE M, PIKE VW, INNIS RB, MCKAY RD. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 2007; **25**: 918–928.

- [40] ROELL W, LEWALTER T, SASSE P, TALLINI YN, CHOI BR, BREITBACH M, DORAN R, BECHER UM, HWANG SM, BOSTANI T, VON MALTZAHN J, HOFMANN A, REINING S, EIBERGER B, GABRIS B, PFEIFER A, WELZ A, WILLECKE K, SALAMA G, SCHRICKEL JW, KOTLIKOFF MI, FLEISCHMANN BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007; **450**: 819–824.
- [41] RONSYN MW, BERNEMAN ZN, VAN TENDELOO VF, JORENS PG, PONSARTS P. Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord* 2008; **46**: 532–539.
- [42] SCHWARTZ RE, REYES M, KOODIE L, JIANG Y, BLACKSTAD M, LUND T, LENVIK T, JOHNSON S, HU WS, VERFAILLIE CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1291–302.
- [43] SOUZA F, SIMPSON N, RAFFO A, SAXENA C, MAFFEIA, HARDY M, KILBOURN M, GOLAND R, LEIBEL R, MANN JJ, VAN HEERTUM R, HARRIS PE. Longitudinal noninvasive PET-based beta cell mass estimates in a spontaneous diabetes rat model. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1506–1513.
- [44] SWIJNENBURG RJ, SCHREPFER S, GOVAERT JA, CAO F, RANSOHOFF K, SHEIKHAY, HADDAD M, CONNOLLY AJ, DAVIS MM, ROBBINS RC, WU JC. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 12991–12996.
- [45] SYKOVA E, JENDELOVA P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2007; **161**: 367–383.
- [46] SYKOVA E, JENDELOVA P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 2006; **3**: 62–67.
- [47] SYKOVA E, JENDELOVA P. Migration, fate and *in vivo* imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1336–1342.
- [48] TAI JH, NGUYEN B, WELLS RG, KOVACS MS, MCGIRR R, PRATO FS, MORGAN TG, DHANVANTARI S. Imaging of gene expression in live pancreatic islet cell lines using dual-isotope SPECT. *J Nucl Med* 2008; **49**: 94–102.
- [49] TATEISHI K, HE J, TARANOVA O, LIANG G, D'ALESSIO AC, ZHANG Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2008; **283**: 31601–31607.
- [50] TERROVITIS J, STUBER M, YOUSSEFA, PREECE S, LEPPOM, KIZANA E, SCHÄRM, GERSTENBLITH G, WEISS RG, MARBÁN E, ABRAHAM MR. Magnetic resonance imaging overestimates ferum-oxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart. *Circulation* 2008; **117**: 1555–1562.
- [51] WANG Q, MATSUMOTO Y, SHINDO T, MIYAKE K, SHINDO A, KAWANISHI M, KAWAI N, TAMIYA T, NAGAO S. Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Med Invest* 2006; **53**: 61–69.
- [52] WEISS ML, MEDICETTY S, BLEDSOE AR, RACHAKATLA RS, CHOI M, MERCHAV S, LUO Y, RAO MS, VELAGALETI G, TROYER D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; **24**: 781–792.
- [53] VALLÉE JP, IVANCEVIC MK, NGUYEN D, MOREL DR, JACONI M. Current status of cardiac MRI in small animals. *MAGMA* 2004; **17**: 149–156.
- [54] YANO S, KURODA S, LEE JB, SHICHINOHE H, SEKI T, IKEDA J, NISHIMURA G, HIDA K, TAMURA M, IWASAKI Y. *In vivo* fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatic injury model of rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2005; **22**: 907–918.
- [55] YOON SH, SHIMYS, PARK YH, CHUNG JK, NAM JH, KIM MO, PARK HC, PARK SR, MIN BH, KIM EY, CHOI BH, PARK H, HA Y. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007; **25**: 2066–2073.
- [56] ZURITA M, VAQUERO J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 2006; **402**: 51–56.

Prof. dr hab. Maciej Kurpisz
Instytutu Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl