NIEKTORÉ POZNATKY O REGENERÁCII

I. Nový pohľad na starý problém

Knowledge concerning regeneration

I. New view of old problem

IX: 213–458, 2007

ISSN 1212–4117

Ján Jakubovský¹, Jozef Novotný², Peter Michalka³, Štefan Durdík⁴

¹ Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta, Ústav patologickej anatómie

² Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra ošetrovatelství

³ Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta, chirurgická klinika

⁴ Onkologický ústav sv. Alžbety, Onkochirurgická klinika LF UK Bratislava, Inštitút fyzioterapie, balneológie a liečebnej rehabilitácie UCM Trnava

Summary

An outline is presented of recent opinions concerning possibilities of the regeneration of cells, organs and tissues by morphological methods. Historical dogmas, which are, however, still valid in medical practice, as well as new approaches to this problem, are recapitulated. The model for studying stem cells are the cells obtained from cell lines participating in the haemopoiesis. The knowledge in this field is advanced to such an extent that their use in the treatment became a standard of medical haematology. This was achieved mainly due to the fact that the blood stem cells can be relatively easily found without the use of embryos. Their differentiating marker is protein CD 34. It is present on their surface. Stem cells can be isolated from the blood of adults. It makes about 0.01% of mononuclear cells there. They can be isolated from the umbilical blood and from the placenta. They are more frequent and more fertile there. Thereafter, when they leave the body and are multiplied, they are injected into the body again as it is known that they are settled directly in the bone marrow, e.g. after a damage to the bone marrow by chemotherapy.

This sympathy between stem blood cells and bone marrow is striking. It informs us about biology of stem cells in general. Under *in vitro* conditions, stem cells are completely missing the environment of the bone marrow. Thus, they cannot survive for long periods. They require the presence of endothelial cells, lipidic cells, fibroblasts, macrophages or osteoblasts and also components of the extracellular matrix. This results in considerations that within the bone marrow, each haemopoietic cell lives in a certain microscopic family of the stroma cells, which take care of it and provide it with appropriate instructions, sometime reminding of the work of bees taking care of their queen. The nests of stem cells are certainly also present in other tissues.

Key words: Regeneration – stem cells – protein CD 34 – stem cells and bone marrow – adaptation – stem types – haemopoiesis

Souhrn

V publikácii sa opisuje prehľad novších názorov na možnosti regenerácie buniek, orgánov a tkanív morfológickými metódami. Rekapitulujú sa historické, ale zatiaľ v praxi lekára platné dogmy aj nové pohľady na tento problém. Modelom pre štúdium kmeňových buniek sú bunky, pochádzajúce z línií buniek, zúčastňujúcich sa krvotvorby. Poznatky na tomto poli pokročili natoľko, že ich používanie v liečbe sa stalo štandardom medicínskej hematológie. Podarilo sa to najmä preto, lebo krvné kmeňové bunky sa dajú pomerne ľahko nájsť bez použitia embryí. Ich odlišujúcim markerom je proteín CD 34. Ten je prítomný na ich povrchu. Kmeňové bunky možno izolovať z krvi dospelých. Tam tvoria zhruba 0,01 % jednodrovných buniek. Možno ich izolovať z krvi pupečníka a z placenty. Tam sú oveľa hojnejšie a plodnejšie. Potom, ako opustia telo a tam sa rozmnožia, vstreknu ich opäť do tela, lebo je známe, že sa usídli rovno v kostnej dreni, napr. potom, keď kostnú dreň zničí che-

moterapia.

Táto sympatia kmeňových krvných buniek a kostnou dreňou je nápadnou. Poučuje nás o biológii kmeňových buniek všeobecne. *In vitro* kmeňovým bunkám úplne chýba prostredie kostnej drene. Preto nemôžu veľmi dlho prežiť. Potrebujú spoločnosť endotelových buniek, tukových buniek, fibroblastov, makrofágov či osteoblastov a rovnako zložiek mimobunkového matrixu. To vedie k úvahám, že v kostnej dreni každá bunka hemopoézy žije v istej mikroskopickej rodine buniek strómy, ktoré ju opatrujú a poskytujú jej náležité inštrukcie, občas pripomínajúce prácu včiel, starajúcich sa v úloch o kráľovnú. Hniezda kmeňových buniek istotne jestvujú aj v iných tkanivách.

Kľúčové slová: regenerácia – kmeňové bunky – proteín CD 34 – kmeňové bunky a kostná dreň – adaptácia – typy buniek – hemopoéza

ÚVOD

Stanovenie formy postihnutia buniek nie je natoľko zložitým problémom, ako by sa mohlo zdať na prvý pohľad. Väčšinu porúch funkcií buniek sprevádzajú štrukturálne zmeny. Tie uľahčujú ich zisťovanie. Naviac nás štrukturálne zmeny vedú k zásadným úvahám o funkčnom význame takých zmien. Preto únik hemoglobínu z erytrocytov naznačuje možnosť poruchy ich povrchových membrán. Isté zmeny vidno už voľným okom. Hypertrofické svalstvo vidno bez mikroskopu. Prítomnosť nadmerného množstva železa v tkanivách sa prejavuje ich hrdzavo hnedou farbou. Preto býva pohľad voľným okom dôležitým prístupom pri hľadaní patologických premien. Svetelným mikroskopom môžeme nadobúdať vedomosti nielen o orto- a patomorfológii skúmaných buniek, tkanív a orgánov, ale metódami histochemie môžeme nadobúdať poznatky o ich biochemickej, imunochemickej či inej povahe na rôznej štrukturálnej úrovni. To umožňuje ich štruktúra. Ich vyšetrenie metódami transmisnej a rastrovej elektrónovej mikroskopie priblíži možnosti morfolologickej lokalizácie či identifikácie rôznych látok na úrovni molekúl alebo atómu (EDAX, SIMS). Tieto nadobúdajú osobitný význam v spojení s inými metódami analýzy biologických materiálov.

Silným nástrojom pre morfológickú diagnostiku je počítačom podporované zariadenie, označené ako fluorescence-activated cell sorter (FACS, triedič buniek aktivovaných fluorescenciou). Umožní rýchlu informáciu o množstve, veľkosti, tvare alebo o špecifických kvalitách prinajmenšom 10.000 buniek. V ľudskej krvi môže rozlíšiť 100 podtypov lymfocytov (De Rosa et al., 2003).

Významnou je tiež miera odchylností od

zvyčajnej normy. Športovec môže mať hmotnosť 3–4 x väčšiu ako asketický mních. Pritom obaja sú ešte normálni. Obaja sa líšia mierou svojho prispôsobenia životu. Oboch pritom do určitej miery postihuje hrozba schopnosti prispôbovať sa (Majno a Joris, 2004). Bunky môžu reagovať na rôzne podnety prispôbením sa. V skutku sa nemusí jednať o zmeny patologické, hoci môže otvárať dvere chorobe. Bunky, orgány a tkanivá sa môžu:

- zmnožiť, aby nahradili straty (regenerácia),
- zvýšiť čo do počtu nad normu (hyperplázia),
- zväčšiť čo do veľkosti (hypertrofia, polyploidita),
- zmenšiť (atrofia),
- zmeniť svoj fenotyp (modulácia – zmena, úprava),
- nahradit' rôznymi inými typmi buniek (metaplázia),
- adaptovať sa organelami (subcelulárna adaptácia).

REGENERÁCIA, ADAPTÁCIA A KMEŇOVÉ BUNKY

V publikácii sa zaoberáme istou formou adaptácie (prispôsobenia sa) – regeneráciou. Akúkoľvek časť tela možno stratiť pre nehodu alebo pre chorobu. Ak jedinec prežije, stratenú časť môže občas nahradit'. Musíme však dačo vedieť o nestálych pravidlách hry. O aké pravidlá sa teda jedná?

Cicavce môžu nahradzovať bunky, aj tkanivá, nie orgány alebo končatiny. Touto vyššou schopnosťou disponujú nižšie živočchy, napr. jašterice, tým môže dorastať chvost. Vyžaduje si to vyladenú regeneráciu mnohých tkanív. Pre takýto proces je oveľa vhodnejším termínom rekonštrukcia (Majno a Joris, 2004). Väčši-

na cicavcov nemôže nahradiť ani koreň vlasu. Ak dôjde k vzniku jaziev, vieme, že sú bez vlasov. Z tohto pravidla jestvujú však isté výnimky. Tak napríklad malé krvné cievy (prekapilárové arterioly, kapiláry a postkapilárové venuly) sa môžu obnoviť, lebo inak by nebolo možné hojenie rán. Aj u detí do veku asi 4,5 roka je údajne možná obnova špičky prsta dotiaľ, dokiaľ je špička jasne oddelená a ak amputácia nastane na vhodnom mieste (Douglas, 1972; Illingword, 1974). Tieto informácie však nie sú úplne dôveryhodné.

Talianský profesor všeobecnej patológie Giulio Bizzózero (1894) opisuje základné pravidlá regenerácie. Uvádza, že počet mitóz v určitých typoch tkaniva je úmerný jeho schopnosti regenerovať sa. Rozdeľuje bunky do troch kategórií:

1. **Labilné bunky.** Majú mitózy počas celého života, regenerujú nepretržite (napr. kostná dreň a epidermis).
2. **Stabilné bunky.** Obsahujú spontánne mitózy. Po narodení sú mimoriadne, vidno ich ako reakciu na podnety (t. j. spojivové tkanivo, hepatocyty).
3. **Permanentné bunky.** Tie v dospelosti nemajú mitózy a nemôžu sa regenerovať (priečne pruhovaný sval a neuróny). Neskôr k tomuto typu pridávajú ďalšie bunky, napr. Sertoliho a vlasové bunky, podocyty v glomerulách a iné bunky.

Túto normu prijímajú ako dogmu, zhoduje sa s každodennou skúsenosťou. Klasifikácia dodnes vyhovuje, hoci novšie pokusy odhaľujú úplne novú panorámu regenerácie. Bizzózero ako prírodovedec opísal to, čo uvidel. Teraz sú však vedci agresívni. Narábajú s bunkami. Pestujú ich *in vitro*, buntujú ich s faktormi rastu a menia ich gény. Vďaka rôznym manipuláciám objavujú, že všetky tkanivá vlastnia bunky kmeňové. Tieto môžu mať mohutný potenciál rastu. Patria k nim aj priečne pruhované svaly, buky srdcového svalu či ľudský mozog.

Čo sú to kmeňové bunky? Koncepcia kmeňových buniek je tak stará ako teória buniek. *Kmeňové bunky sú nediferencované bunky, ktoré sú schopné behom života obnoviť sa, utvoriť jeden či viacero typov buniek.* Každá dospelá bunka má „matku“ (táto sa môže deliť v priebehu života) a líniu predkov kmeňových buniek so zvýšeným potenciálom k rozdeleniu sa (Gage, 2000; Hall

a Watt, 1989). Koncové kmeňové bunky predstavujú bunky včasného embrya. Tieto je možné považovať za *totipotentné* (schopné rozvíjať sa hocikakým smerom). Ich línie sa šíria v plodoch, a aj v dospelých. Tam sa vyskytujú ako *multipotentné* bunky. Tie, ktoré sú bližšie koncovej diferenciácii, sa označujú buď za *progenitorové, committed* (odovzdávajúce), alebo za *prechodné* bunky. Nomenklatúra je stále v štádiu vývoja.

V bežných histologických rezoch je hľadanie kmeňových buniek ľahké iba v epiteliom leme. Tým je napríklad *epidermis*, lebo kmeňové bunky nasadajú na *membrana basalis*. V druhých tkanivách je hľadanie kmeňových buniek frustrujúce, lebo podľa vymedzenia ich pojmu sa jedná o bunky nevyhraného vzhľadu, teda o bunky nediferencované. Zvyčajne ich rozoznávajú imunohistochemicky zistením rozlišujúcich antigénov na ich povrchu či v cytoplazme. Rozhodujúcim testom je rast očakávaných kmeňových buniek *in vitro* a štart ich diferencovania vhodným rastovým faktorom. Ak sa kmeňová bunka replikuje, mitóza môže byť symetrická (vzniknú dve kmeňové bunky) alebo asymetrická (vzniká jedna kmeňová bunka a jedna progenitorová, alebo diferencovaná bunka).

Osnovu „hniezd“, zrodenú z čirej špekulácie, potvrdili Zhang et al. (2003) elegantným pokusom *in vivo*. Kostné trávce pokrývajú bunky endoostu. Medzi nimi sú zhľuky mimoriadnych SNO (Spindle-shaped N-cadherin⁺ CD45⁺) buniek, osteoblastov. Ide o kľúčovú zložku hniezd. Zadržujú kmeňové bunky hemopoézy pomocou N-cadherínu a beta-catenínu. Spomenuté, biologicky aktívne látky sa nachádzajú v tesných junkciách (Zhang et al., 2003).

Technické problémy výskumu kmeňových buniek sú veľké, komplikované etickými, aj politickými spormi. Predovšetkým si potrebujeme položiť nasledovné otázky: Čo môžeme očakávať od kmeňových buniek? Ako ich možno inštruovať k rozlíšeniu sa na požadované špecializované bunky? Ako ich možno umiestniť tam, kde ich vskutku treba? Ako dlho prežijú a pôsobia? Môžu generovať nádory alebo iné problémy? Možno používať ľudské embryové kmeňové bunky? Ako pôsobia kmeňové bunky, pochádzajúce z krvných kmeňových buniek, ktoré prirovnávajú kmeňovým bunkám embryí ľudí? (Pittenger et al., 1999). Zatiaľ stále zostávajú isté otázky, ktoré je treba zodpovedať (Danišovič et al., 2007). V perspektíve zostáva

skromná nádej budovať časti ľuďí. Väčšina uvedeného ostáva hudbou budúcnosti. Určité ohurujúce výkony už vykonali, osobitne na myšiach. Ich výsledky by možno ohromili nielen historicky známe osobnosti.

Nedávno predstavovali kmeňové bunky titulky publicistov nielen z hľadiska politických a etických výstupov, ale tiež z hľadiska im pripisovaných úloh. Koho by neudivilo počúvať o krvných kmeňových bunkách, premieňajúcich sa na pečeň (Lagasse et al., 2000; Petersen et al., 1999), na myokard (Bittner et al., 1999) alebo o bunkách kože, meniacich sa na neuróny (Tuszynski a Kordower, 1999). Teraz je treba čakať na iný obraz, ktorý uvidíme po usadení sa zvráteného prachu (Abkovitz, 2002; Anderson et al., 2001). Výsledky práce publikovanej pod patetickým titulom „*Turning Brain into Blood*“ (Bjornson et al., 1999) iní autori nedokázali (D'Amour a Gage, 2002). Veľa presvedčivých dôkazov ukazuje, že mnohopotentné kmeňové bunky hemopoézy tvorí od začiatku zmiešaná skupina buniek (Orkin a Zon, 2002). Holden a Vogel (2002) ukazujú, že kmeňové bunky, ktoré injikovali do vén, môžu splývať s bunkami hostiteľa, aj budiť bunky vzhľadu kmeňových buniek embryí. Majú však dvojnásobný počet chromozómov. Asi nie sú geneticky stabilné. Ako príklad uvedieme regeneráciu epitelu.

Epitel regeneruje veľmi dobre, až na niekoľko už spomenutých výnimiek.

Povrchový epitel – všetky povrchové epitely sú programované na regenerovanie cez poškodené oblasti. Regenerácia nastáva dvojfázovo, podobne ako regeneruje endotel. Najnaliehavejšou úlohou jeho regenerovania je pokrytie exponovaného povrchu spojivového tkaniva. Zmyslom regenerácie je uzavretie dverí pri infekcii, ale nie krvným doštičkám. Epitelové bunky sa teda šíria z okrajov rany na povrch poškodenia vrstvou lamelových výbežkov (Watanabe a Mitchinson, 2000). Nové epitelové bunky vzniknú asi 1–2 mm od okraja rany. Je možné, že bunky sa môžu pohybovať alebo rozmnožovať (Steen a De Palma, 1988). Postupujúce bunky môžu urýchliť svoju úlohu tvorbou laniak aktínových vlákien. Tieto prebiehajú okrajom rany a účinkujú ako povrázok mešca (Jacinto et al., 2001; Lotz et al., 2000; Martin a Lewis, 1992). V priebehu pokrytia štrbín, nediferencované bunky vyzrievajú na požadované typy, napr. na bunky s ciliami alebo na hlienotvorné

bunky (Gordon a Lane, 1980).

DISKUSIA A ZÁVER

Modelom pre štúdium kmeňových buniek sú bunky pochádzajúce z línií buniek zúčastňujúcich sa krvotvorby. Poznatky na tomto poli pokročili natoľko, že ich používanie v liečbe sa stalo štandardom medicínskej hematológie. Poďakilo sa to najmä preto, lebo krvné kmeňové bunky sa dajú pomerne ľahko nájsť bez použitia embryí. Ich odlišujúcim markerom je proteín CD 34. Ten je prítomný na ich povrchu. Kmeňové bunky možno izolovať z krvi dospelých. Tam tvoria zhruba 0,01 % jednojadrových buniek. Možno ich izolovať z krvi pupočníka a z placenty. Tam sú oveľa hojnejšie a plodnejšie. Potom, ako opustia telo a tam sa rozmnožia, vstriknu ich opäť do tela, lebo je známe, že sa usídli rovno v kostnej dreni, napr. potom, keď kostnú dreň zničí chemoterapia.

Táto sympatia kmeňových krvných buniek s kostnou dreňou je nápadnou. Poučuje nás o biológii kmeňových buniek všeobecne. *In vitro* kmeňovým bunkám úplne chýba prostredie kostnej drene. Preto nemôžu veľmi dlho prežiť. Potrebujú spoločnosť endotelových buniek, tukových buniek, fibroblastov, makrofágov či osteoblastov a rovnako zložiek mimobunkového matrixu. To vedie k úvahám, že v kostnej dreni každá bunka hemopoézy žije v istej mikroskopickkej rodine buniek strómy, ktoré ju opatrujú a poskytujú jej náležité inštrukcie, občas pripomínajúce prácu včiel, starajúcich sa v úľoch o kráľovnú. Hniezda kmeňových buniek istotne jestvujú aj v iných tkanivách.

LITERATÚRA

- ABKOWITZ, J. L.: Can human hematopoietic stem cells become skin, gut, or liver cells? *N. Engl. J. Med.* 2002, 346 (10): 770–772.
- ANDERSON, D. J., GAGE, F. H., WEISSMAN, I. L.: Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.*, 2001, 7, 393–395.
- BITTNER, R. E., SCHÖFER, C., WEIPOLTSHAMMER, K., IVANOVA, S., STREUBEL, B., HAUSER, E.: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mds mice. *Anat. Embryol.*, 1999, 199, 391–396.
- BJORNSON, C. R. R., RIETZE, R. L., REYNOLDS, B. A., MAGLI, M. C., VESCOVI, A. L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neutral stem cells in vivo. *Science*, 1999; 283; 534–537
- D'AMOUR, K. A., GAGE, F. H.: Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? *Nat. Med.*, 2002, 8, 213–214.

- DANIŠOVIČ, L., LESNÝ, P., HAVLAS, V., TEYS-SLER, P., SYROVA, Z., KOPÁNI, M., FUJERÍKOVA, G., TRČ, T., SYKOVÁ, E., JENDELOVA, P.: Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Applied Biomedicine*, 5, 2007, p. 139–150.
- DE ROSA, S. C., BRENCHELEY, J. M., ROEDERER, M.: Beyond six colors: a new era in flow. *Nat. Med.*, 2003, 1, (1): p. 112–117.
- DOUGLAS, B. S.: Conservative management of guillotine amputation of the finger in children. *Aust. Paediatr J.*, 1972, 8 (2): p. 86–89.
- FREILINGER, M., HÖGER, H., ELBE-BÜRGER, A., WACHTLER, F.: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol.* Berlin. 1999, 199 (5): 391–396.
- GAGE, F. H.: Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287(5457): p. 1433–1438. Review.
- GORDON, R. E., LANE, B. P.: Wound repair in rat tracheal epithelium. Division of G1 and G2-arrested cells following injury. *Lab. Invest.*, 1980, 42(6): p. 616–621.
- HALL, P. A., WATT, F. M.: Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 1989, 106 (4): p. 619–633.
- HOLDEN, C., VOGEL, G.: Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science*, 2002, 296 (5576): p. 2126–2129.
- ILLINGWORTH, C. M.: Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J. Pediatr. Surg.*, 1974, 9 (6): p. 853–858.
- JACINTO, A., MARTINEZ-ARIAS, A., MARTIN, P.: Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3 (5): E117–123. Review.
- LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L., WANG, X., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I. L., GROMPE, M.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, 2000, 6 (11): p. 1229–1234.
- LOTZ, M. M., RABINOVITZ, I., MERCURIO, A. M.: Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing. *Am J. Pathol.*, 2000, 156 (3): p. 985–989.
- MAJNO, G., JORIS, I.: *Cells, Tissues, and Disease. Principles of General Pathology*. Oxford University Press New York: Oxford, 2004.
- MARTIN, P., LEWIS, J.: Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature*. 1992, 360 (6400): p. 179–183.
- ORKIN, S. H., ZON, L.I.: Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol.*, 2002, 3 (4): p. 323–328. Review.
- PETERSEN, B. E., BOWEN, W. C., PATRENE, K. D., MARS, W. M., SULLIVAN, A. K., MURASE, N., BOGGS, S. S., GREENBERGER, J. S., GOFF, J. P.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284 (5417): p. 1168–1170.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MORRIS, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411): p. 143–147.
- STEEN, K. S., DEPALMA, L.: Re-epithelialization. In: Clark, R. A. F., Henson, P. M. (eds): *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1988, p. 321–335.
- TUSZYNSKI, M. H., KORDOWER, J. H.: (eds) *CNS regeneration. Basic science and clinical advances*. San Diego: Academic Press, 1999.
- WATANABE, N., MITCHISON, T. J.: Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science*, 2002, 295 (5557): p. 1083–1086.
- ZHANG, J., NIU, C., Y. E., L., HUANG, H., H. E. X., TONG, W. G., ROSS, J., HAUG, J., JOHNSON, T., FENG, J. Q., HARRIS, S., WIEDEMANN, L. M., MISHINA, Y., L. I., L.: Identification of the haematopoietic

Ján Jakubovský et al.
jnovotny@zsf.jcu.cz