

Małgorzata Wegner¹, Tadeusz Pietrucha², Maria Pioruńska-Stolzmann¹

¹Zakład Chemii Ogólnej Katedry Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Terapia komórkowa w leczeniu cukrzycy typu 1 — czy będzie możliwa?

Cellular therapy in diabetes type 1 — will it be possible?

STRESZCZENIE

Cukrzyca typu 1 powstaje wskutek nieodwracalnego zniszczenia komórek beta wysp trzustkowych, co prowadzi do zaburzeń, a nawet całkowitego zaniechania produkcji insuliny. Mimo ogromnego postępu w leczeniu tej choroby nadal u większości pacjentów na pewnym etapie choroby dochodzi do rozwoju późnych powikłań cukrzycowych. Dlatego też cukrzyca typu 1 stała się jednym z celów terapii komórkowej. Obecnie uzyskiwanie zróżnicowanych komórek beta wysp trzustkowych w hodowlach *in vitro* pozostaje na etapie badań naukowych. Jednak w wielu pracach wykazano, że w przyszłości będzie możliwe otrzymywanie komórek beta produkujących insulinę i wrażliwych na stężenie glukozy we krwi, które będzie można wszczepiać chorym na cukrzycę typu 1. Powodzenie tej terapii zależy jednak od wielu czynników, między innymi od wypracowania bezpiecznych protokołów uzyskiwania komórek beta wysp trzustkowych oraz zadbania o to, aby wszczepione komórki nie pobudzały odpowiedzi immunologicznej biorcy oraz zachowały swoje biologiczne funkcje. (Diabet. Prakt. 2009; 10, 4: 157–161)

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 1, komórki macierzyste, terapia komórkowa

Adres do korespondencji: mgr Małgorzata Wegner
Zakład Chemii Ogólnej, Katedra Chemii
i Biochemii Klinicznej UM im. K. Marcinkowskiego
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań
tel.: (061) 854 65 90, faks: (061) 854 65 99
Diabetologia Praktyczna 2009, tom 10, 4, 157–161
Copyright © 2009 Via Medica
Nadesłano: 04.09.2009 Przyjęto do druku: 23.09.2009

ABSTRACT

Type 1 diabetes is results from the irreversible damage of the pancreatic beta cells which leads to disturbance and even to total termination of insulin production. Despite enormous progress in the treatment of type 1 diabetes still most of the patients develop late diabetic complications. Because of that, type 1 diabetes is one of targets of the cellular therapy. Nowadays, *in vitro* culture of differentiated beta cells continues to be at the scientific research level. However several studies indicate that in the future it would be possible to culture pancreatic insulin-producing beta cells which would be sensitive to glucose level in blood and which would be possible to be injected to type 1 diabetic patients with . Success of such treatment will depend however on many factors, including safe protocols to culture beta cells. Additionally, it would also be important to make sure that immunological response against cells will not appear and that such cells will maintain their biological features. (Diabet. Prakt. 2009; 10, 4: 157–161)

Key words: type 1 diabetes, stem cells, cellular therapy

Wstęp

Komórki macierzyste (SCs, *stem cells*) oraz związana z nimi terapia komórkowa jako potencjalna metoda leczenia wielu schorzeń stanowią cel badań wielu pracowni naukowych [1, 2].

Komórki macierzyste są komórkami niezróżnicowanymi. Wykazują zdolność do różnicowania w komórki o określonych funkcjach, przy jednoczesnej zdolności do nieograniczonej proliferacji i od-

nawiania własnej populacji, dlatego są uważane za komórki nieśmiertelne [3–5].

Ze względu na zdolność do różnicowania SCs dzieli się na: totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne i unipotencjalne. Z komórek totipotencjalnych powstają wszystkie komórki organizmu oraz łożysko. Taką cechą wykazuje zygota. Komórki pluripotencjalne mogą się różnicować w komórki 3 listków zarodkowych [6], natomiast komórki multipotencjalne dają początek komórkom należącym do tego samego listka zarodkowego lub tej samej tkanki. Komórki unipotencjalne, nazywane progenitorowymi, przeobrażają się tylko w 1 rodzaj komórek somatycznych [7].

Ze względu na pochodzenie SCs wyróżnia się komórki embrionalne, uczestniczące w organogenezie, oraz somatyczne (progenitorowe), których rolą jest regeneracja tkanek dorosłego organizmu [8]. Do niedawna uważano, że pluripotencjalny charakter wykazują tylko komórki pochodzenia embrionalnego, natomiast SCs dorosłego organizmu mają zdolność różnicowania się tylko w obrębie tej samej tkanki. Jednak najnowsze doniesienia wskazują, że mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs, *mesenchymal stem cells*) szpiku kostnego mogą ulegać przekształceniu w komórki nerwowe [9].

Komórki macierzyste — potencjalne możliwości terapii cukrzycy typu 1

Źródła komórek macierzystych

Najczęstszym źródłem uzyskiwania SCs są embriony na bardzo wczesnym etapie rozwoju (do 6. dnia) pochodzące z niewykorzystanych komórek w zapłodnieniu *in vitro*, z embrionów uzyskanych metodą klonowania lub z tkanek uzyskanych w wyniku poronienia. Alternatywnymi źródłami uzyskiwania SCs, niebudzącymi wątpliwości etyczno-moralnych, są szpik kostny, krew pępowinowa oraz tkanki dorosłego człowieka, między innymi także pośmiertne. Zdolność różnicowania dojrzałych SCs jest, co prawda, mniejsza niż embrionalnych, jednak w przypadku klinicznego zastosowania komórek progenitorowych jest niwelowany problem odpowiedzi immunologicznej [10].

Pluripotencjalność komórek macierzystych

Dobranie warunków hodowli SCs jest możliwe dzięki coraz większej wiedzy o czynnikach odpowiedzialnych za utrzymywanie pluripotencjalności oraz znajomości mechanizmów różnicowania i re-

programowania. Wyniki badań wskazują, że jednym z wielu czynników wpływających na utrzymanie pluripotencjalności ludzkich SCs jest kompleks białkowy SWI/SNF remodelujący chromatynę, nazywany esBAF. Jest on odpowiedzialny za destabilizację połączeń DNA–histony i uczestniczy w ekspresji genów biorących udział w utrzymywaniu pluripotencjalności [11]. Z zachowaniem pluripotencjalności wiąże się również obecność białka Oct4 (czynnika transkrypcyjnego), które hamuje proces różnicowania [6].

Otrzymywanie komórek beta wysp trzustkowych

Prowadzone są liczne badania mające na celu otrzymanie komórek beta wysp trzustkowych przydatnych w terapii komórkowej cukrzycy typu 1 [12–14].

Sugeruje się, że dorosły organizm posiada komórki progenitorowe dla trzustki, które mogłyby się stać źródłem komórek, z których można by otrzymać komórki beta wysp trzustkowych. W czasie embriogenezy trzustka jest formowana z cewy trzustkowej, z której pochodzą zarówno komórki endokrynne, jak i groniaste. W okresie dojrzałości komórki z cewy nadal wykazują zdolność do różnicowania i ekspansji, co jest cechą charakterystyczną dla SCs. Dodatkowo część komórek wysp trzustkowych ulega podziałom i różnicowaniu w komórki produkujące insulinę, choć proces ten jest ograniczony. Przykładem potwierdzającym takie przypuszczenia było wyizolowanie komórek z trzustki, które w hodowli *in vitro* przekształcały się w różnorodne komórki endokrynne, w tym komórki produkujące insulinę [13]. Członkowie innych zespołów badawczych uważają natomiast, że populacja komórek beta wysp trzustkowych jest odbudowywana z istniejących już zróżnicowanych komórek, które zachowują zdolność do proliferacji [14].

Innymi komórkami uwzględnianymi w terapii komórkowej cukrzycy typu 1 są embrionalne komórki macierzyste (ESCs, *embryonic stem cells*). W warunkach *in vitro* otrzymano z nich komórki o wysokiej ekspresji insuliny. Proces ten nie jest jednak efektywny, ponieważ spontanicznie z ESCs powstaje tylko 1–3% komórek beta wysp trzustkowych wykazujących wrażliwość na wzrost stężenia glukozy w medium. Uzyskanie większej liczby komórek beta tą drogą jest złożone. W pierwszym etapie należy użyć odpowiednich czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*) oraz czynnik wzrostu neuronów (NGF, *nerve growth factor*). Prowadzi to do różnicowania w kierunku komórek endodermalnych, z których po-

chodzą komórki produkujące insulinę. Kolejnym etapem jest zwiększenie ekspresji czynników transkrypcji inicjujących ekspresję genów warunkujących rozwój komórek beta wysp trzustkowych. Efekt ten można uzyskać poprzez infekcję hodowli wirusem zawierającym specyficzny gen promotora genów o wysokiej ekspresji w komórkach beta połączony z genem oporności na antybiotyk. W celu wyselekcjonowania komórek zawierających gen promotora prowadzi się hodowlę w medium z odpowiednim antybiotykiem. Liew i wsp. [15] zauważyli, że wywołanie nadekspresji czynnika transkrypcji Pax4 w ludzkich ESCs powoduje zwiększone różnicowanie tych komórek w komórki produkujące insulinę, wrażliwe na wahania stężenia glukozy w medium. Należy jednak podkreślić, że uzyskane dotychczas z ESCs komórki beta produkujące insulinę komórek nie wykazywały profilu fizjologicznego i nie zachowywały się w warunkach *in vivo* w ten sam sposób jak komórki powstałe w wyniku ontogenezy [16].

Niejednoznaczność wyników badań związanych z progenitorowymi komórkami oraz kontrowersyjność stosowania ESCs sprawiają, że poszukuje się alternatywnych metod uzyskiwania komórek produkujących insulinę. Wykazano, że MSCs szpiku posiadają zdolność do różnicowania się w wiele różnych linii komórkowych: fibroblasty, chondrocyty, osteoblasty czy miocyty. Tak duża plastyczność oraz dostępność tych komórek powoduje, że są one źródłem zainteresowania ośrodków naukowych, w celu wykorzystania ich w leczeniu wielu chorób, w tym cukrzycy typu 1 [17, 18]. Na podstawie właściwości MSCs Karnieli i wsp. [19] przeprowadzili badania mające na celu otrzymanie komórek beta wysp trzustkowych. Bazując na obserwacjach dotyczących roli czynnika transkrypcyjnego PDX1 zaprezentowali procedurę różnicowania komórek MSCs w komórki beta wysp trzustkowych. Już wcześniej zaobserwowano, że ekspresja na stałym poziomie czynnika transkrypcyjnego PDX1 warunkuje reprogramowanie hepatocytów w komórki o fenotypie zbliżonym do komórek produkujących insulinę. Wychodząc z tego założenia, wykonano transfekcję MSCs pochodzącym od dawców szpiku retrowirusem zawierającym gen szczurzego *Pdx-1*. Zainfekowane komórki zaczęły produkować insulinę, a sekrecja hormonu była regulowana przez stężenie glukozy w medium [19]. Nad inną metodą otrzymywania komórek produkujących insulinę z MSCs szpiku pracował zespół naukowców japońskich. Szpik pochodził od pacjentów z cukrzycą typu 1. Protokół otrzymania komórek beta składał się z 3 etapów. Początkowo komórki hodowano w medium z niewielkim stężeniem glukozy (DMEM, *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*). Następnie pasażowano komórki do medium zawierającym aminokwasy oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*). Ostatecznie hodowlę prowadzono w medium z betaceluliną oraz aktywiną, czynnikami wzrostu regulującymi różnicowanie SCs w komórki beta wysp trzustkowych. Wyhodowane komórki wykazywały zdolność do produkcji insuliny, a co najważniejsze — były wrażliwe na zmianę stężeń glukozy [20]. Z kolei inny zespół naukowy zaobserwował reprogramowanie komórek w odwrotnym kierunku, czyli z komórek beta wysp trzustkowych w MSCs, pod wpływem dodania surowicy do medium. Jednocześnie stwierdzono, że usunięcie z medium surowicy spowodowało powrót cech komórek beta wysp trzustkowych [21].

Kolejnym potencjalnym źródłem komórek, które można by wykorzystać w terapii komórkowej, są komórki macierzyste krwi pępowinowej (UCBs, *umbilical cord blood cells*). Ich uzyskiwanie nie wiąże się z występowaniem powikłań u dawcy, a pobranie nie wymaga skomplikowanych procedur. Badania wskazują, że wszczepione UCBs migrują w obręb uszkodzonych naciekami limfocytarnym komórek beta wysp trzustkowych, różnicując się w kierunku komórek produkujących insulinę. Ponadto UCBs prawdopodobnie łagodzą proces autoimmunologiczny toczący się w obrębie wysp Langerhansa u osób z cukrzycą typu 1, poprzez supresję aktywności limfocytów T [22].

Komórki macierzyste w leczeniu cukrzycy typu 1

Do 1922 roku, w którym Frederic Banting wraz z Charlesem Bestem odkryli insulinę, cukrzyca typu 1 była chorobą śmiertelną [23]. Od tamtego przełomowego odkrycia osiągnięto ogromny postęp w leczeniu chorych na cukrzycę typu 1. Stosowana powszechnie metoda intensywnej insulinoterapii pozwala pacjentom na aktywne i długie życie. Jednak nie jest ona wolna od niedoskonałości. Często utrzymanie normoglikemii przez długi czas jest trudne do osiągnięcia, co prowadzi do rozwoju późnych powikłań cukrzycowych, takich jak: nefropatia, retinopatia, neuropatia czy choroba niedokrwienna serca [16]. Dlatego też poszukuje się metod bardziej skutecznego leczenia cukrzycy typu 1, a terapia komórkowa może być procedurą możliwą do zastosowania [19, 24]. Chociaż ten rodzaj terapii nie prowadziłyby do bezpośredniego wyeliminowania przy-

czynny cukrzyca typu 1, jej zastosowanie zmniejszyłoby ryzyko powtórnego nacieku limfocytarnego komórek beta wysp trzustkowych i nawrotów objawów choroby. Zastosowanie terapii komórkowej w leczeniu tej choroby ma dużą szansę powodzenia, ponieważ zniszczeniu ulegają tylko selektywne komórki, a nie cała tkanka czy organ, które relatywnie łatwo można zastąpić prawidłowymi komórkami pochodzącymi z hodowli *in vitro*. Dodatkowo otrzymywanie komórek beta wysp trzustkowych metodą *in vitro* zmniejszyłoby niebezpieczeństwo immunogenności, a także — poprzez zwiększenie dostępności komórek beta — umożliwiłoby wykonywanie przeszczepów na większą skalę. Obecnie przeprowadza się przeszczepy całej trzustki albo tylko komórek beta wysp trzustkowych, jednak źródła tych komórek są bardzo ograniczone, ponieważ pochodzą od osób zmarłych.

Zastosowanie terapii komórkowej nie ogranicza się tylko do bezpośredniego zastępowania zniszczonych komórek beta wysp trzustkowych. Być może już w niedalekiej przyszłości będzie możliwe leczenie terapią komórkową przewlekłych owrzodzeń i ran na kończynach dolnych, nazywanych stopą cukrzycową. Metodą, która pozwoliłaby na leczenie tego schorzenia, jest hodowla fibroblastów pobranych z owrzodzenia w obecności czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Zastosowanie GM-CSF miałoby na celu pobudzenie migracji i proliferacji keratynocytów [25].

Zastosowanie terapii komórkowej w leczeniu cukrzycy typu 1 i jej powikłań, oprócz bezpośredniej poprawy i przedłużenia życia pacjentów, dałoby również efekt ekonomiczny. Dane z Banku Światowego wskazują, że cukrzyca zajmuje 2. miejsce w skali wielkości obciążenia ekonomicznego społeczeństwa spośród wszystkich chorób, a leczenie za pomocą komórek zredukowałoby nakłady finansowe związane z terapią cukrzycy typu 1 [26].

Niebezpieczeństwa wynikające z terapii komórkowej

Komórki macierzyste, ze względu na swoje możliwości nieograniczonego podziału oraz niezróżnicowanie, łatwo ulegają przeobrażeniom w komórki nowotworowe [4]. Potwierdzają to obserwacje dotyczące hodowli komórek macierzystych *in vitro*. Komórki hodowane *in vitro* często ulegają zmianom genetycznym i kariotypowym prowadzącym do transformacji nowotworowej [27]. Wprowadzenie SCs czy też już zróżnicowanych w wyniku hodowli *in vitro* ich pochodnych do organizmu ludzkiego

w celu zastosowania leczenia przyczynowego wiąże się ze wzrostem ryzyka rozwoju nowotworu u biorcy.

Należy również zwrócić uwagę, że zastosowanie terapii komórkowej u chorych na cukrzycę typu 1 nie wyeliminuje u nich przyczyny schorzenia, a jedynie uniezależni pacjentów od konieczności wykonywania codziennych iniekcji insuliny i kontroli wartości glikemii. W każdym momencie może dojść do wznowy choroby na skutek ponownej destrukcji wszczepionych komórek beta wysp trzustkowych [16].

Podsumowanie

Wstępne wyniki badań dotyczące hodowli *in vitro* komórek beta budzą dużą nadzieję, że wprowadzenie terapii komórkowej jako metody leczenia cukrzycy typu 1 będzie możliwe. Wymaga to jednak jeszcze wiele czasu i zaangażowania osób pracujących nad rozwojem tej terapii u chorych na cukrzycę.

PIŚMIENNICTWO

1. Krawetz R.J., Li X., Rancourt D.E. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays*. 2009; 3: 336–343.
2. Bormer-Weir S., Sharma A. Pancreatic Stem cells. *J. Pathol.* 2002; 197: 519–526.
3. Witoń M. Komórki macierzyste. *Laboratorium* 2007; 7/8: 51–52.
4. Olszewska-Słonina D.M., Styczyński J., Drewna T.A., Czajkowski R. Stem cells-sources and plasticity. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006; 15: 497–503.
5. Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287–298.
6. Pesce M., Scholer H. Oct 4: gatekeeper in the beginning of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271–278.
7. Biesaga T. Komórki macierzyste i klonowanie człowieka — nadzieje i zagrożenia. *Med. Prakt.* 2004; 10: 21–29.
8. Alison M.R., Poulson R., Forbes S., Wright N.A. An introduction to stem cells. *J. Pathol.* 2002; 197: 419–423.
9. Montzka K., Lassonczyk N., Tschöke B. i wsp. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 2009; 10: 16.
10. Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287–298.
11. Ho L., Ronsan J.R., Wu J. i wsp. An embryonic stem cells chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 3: 1–6.
12. Gallo R., Gombelli F., Gava B. i wsp. Generation and explanation of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death Different.* 2007; 14: 1860–1871.
13. Alison M.R., Poulson R., Forbes S., Wright N.A. An introduction to stem cells. *J. Pathol.* 2002; 197: 419–423.
14. Lee D.D., Grossman E., Chong A.S., Werner A. Cellular therapies for type 1 diabetes. *Horm. Metab. Res.* 2008; 40: 147–154.
15. Liew Ch.G., Shah N.N., Briston S.J. i wsp. Pax4 enhances beta cell differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2008; 12: e1783.

16. Beattie G.M., Hayek A. Human embryonic stem cells and type 1 diabetes: how far for the clinic? *Permanent J.* 2004; 8: 11–14.
17. Urbaniak-Kujda D., Wołowicz D., Tomaszewska-Toporska B., Kapelko-Słowik K., Kuczkowski K. Mezenchymalne komórki macierzyste: ich biologia i perspektywy zastosowań klinicznych. *Acta Haematol. Pol.* 2007; 36: 161–166.
18. Urban V.S., Kiss J., Kovacs J. i wsp. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 2008; 26: 24–53.
19. Karneli O., Izhar-Prato Y., Bulvik S., Efrot S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 2007; 25: 2837–2844.
20. Yu S., Li Ch., Xin-Guo H. i wsp. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin. Med. J.* 2007; 120: 771–776.
21. Gallo R., Gombelli F., Gava B. i wsp. Generation and explanation of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death Different.* 2007; 14: 1860–1871.
22. Heller M.J., Viener H.L., Wasserfall C., Brusko T., Atkinson M.A., Schatz D.A. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 710–715.
23. Jarosz-Chrobot P., Otto-Buczkowska E. Możliwości terapii cukrzycy za pomocą podskórnego wlewu insuliny ludzkich. *Diabet. Prakt.* 2005; 6: 260–265.
24. Navang A.S., Mahato R.J. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol. Rev.* 2006; 58: 194–243.
25. Brem H., Golinko M.S., Stojadinovic O. i wsp. Primary cultured derived from patients with chronic wounds: a methodology to produce human cell lines and test putative growth factor therapy such as GM-CSF. *J. Transl. Med.* 2008; 6: 1–9.
26. Kawalec P., Kielar M., Pilc A. Koszty leczenia cukrzycy typu 1 i 2 w Polsce. *Diabet. Prakt.* 2006; 7: 287–294.
27. Humpherys D., Eggan K., Akutse H. i wsp. Epigenetic instability, ES wells and clonal mice. *Science* 2001; 293: 95–97.