

Kmenové buňky: nový příslib v medicíně

M. Klabusay¹, P. Dvořák², J. Mayer¹

¹ Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

² Laboratoř molekulární embryologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR, Brno, vedoucí doc. Ing. Petr Dvořák, CSc.

Souhrn: Kmenové buňky, embryonální i somatické, přitahují v současnosti pozornost vědecké i lékařské odborné veřejnosti. Pro svou schopnost dlouhodobé sebeobnovy a diferenciaci by se kmenové buňky mohly stát klíčem k léčbě závažných onemocnění, a proto jsou předmětem celosvětového výzkumu řady vědeckých týmů. Tento článek předkládá čtenáři stručný náhled na současný stav poznání v problematice lidských kmenových buněk. V úvodu se autoři věnují definici kmenových buněk a základním otázkám nomenklatury. V kapitole o embryonálních kmenových buňkách pak předkládají historický přehled výzkumu, principy průkazu pluripotence a jejich potenciální terapeutické aplikace. V kapitole o somatických kmenových buňkách se autoři věnují jejich obecné definici a klasifikaci, možnostem jejich průkazu v tkáních a diskutovaném fenoménu plasticity. Následuje přehled hlavních typů somatických kmenových buněk, zejména neuronálních, endoteliálních, svalových, epitelálních, pankreatických a jaterních. Kmenovým buňkám kostní dřeni bude vzhledem k jejich experimentálnímu i klinickému významu věnován samostatný článek. Výzkum kmenových buněk má před sebou stále více nezodpovězených otázek než odpovědí.

Klíčová slova: kmenové buňky – celulórní terapie – plasticita kmenových buněk

Stem cells: new promise in medicine

Summary: The stem cells – both embryonic and adult – attract the attention of scientific and medical community nowadays. They could become a key to the treatment of serious diseases, because of their ability of the long-term self-renewal and differentiation. Many scientists around the world pay attention to stem cells research. This article gives a brief overview of the state-of-the-art of our knowledge about the human stem cells. In the introduction, the definition of stem cells and their nomenclature are described. In the chapter about embryonic stem cells, historical background, proof of pluripotency, and potential therapeutical applications are summarized. In the chapter about adult stem cells, the definitions and classification, their detection in tissue, and the phenomenon of plasticity are mentioned. The description of major types of adult stem cells follows: neuronal, endothelial, muscle, epithelial, pancreatic and liver stem cells. Stem cells from bone marrow will be described in a separate article, because of their role in medicine and research. However, there are still more unanswered questions than available answers in the stem cell research.

Key words: stem cells – cellular therapy – plasticity of stem cells

1. Úvodem

Není mnoho oblastí medicíny, které by v poslední době přitahovaly tolik pozornosti jako právě problematika kmenových buněk. Samozřejmě atraktivita kmenových buněk stojí na základech pokroku v molekulární a buněčné biologii, genovém inženýrství a klonování. Z teoretického hlediska mají kmenové buňky téměř neomezený potenciál v humánní medicíně díky své schopnosti sebeobnovy a diferenciaci.

Lidské embryonální kmenové buňky byly izolovány z embryí a úspěšně kultivovány poprvé v roce 1998. Zároveň se objevovalo mnoho nových informací o somatických kmenových buňkách, tj. buňkách, které se

v malých počtech nacházejí ve specializovaných tkáních těla a které jsou schopny diferencovat do určitých buněčných typů. V posledních letech se objevují nové fascinující zprávy o tzv. plastičnosti těchto buněk – jejich schopnosti diferencovat do ontogeneticky rozdílných buněčných linií.

2. Co je kmenová buňka?

Kmenová buňka je buňka, která je schopna se dělit (sebereplikovat) po neomezenou dobu – často po dobu života organismu, aniž by se přitom diferencovala. Za určitých podmínek (dostane-li správný signál) se kmenová buňka diferencuje do mnoha rozdílných typů buněk, které tvoří

tkáň. Jinými slovy, kmenová buňka má potenciál vyvíjet se do zralých buněk majících charakteristické morfologické vlastnosti a specializované funkce, jako jsou myocyty, kožní buňky či neurony.

Rozlišujeme 2 hlavní typy kmenových buněk: **embryonální kmenové buňky** a **somatické** či **orgánové kmenové buňky**. (Protože české termíny nejsou zatím příliš zažitě, budeme se v textu držet anglického označení – **embryonic stem cells** – **ESC** a **adult stem cells** – **ASC**). Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou definovány svým původem – tj. tím, že pocházejí z nejčasnějších fází vývoje embrya, z blastocysty. ESC jsou odvozeny z vnitřní buněčné ma-

sy blastocysty ve stadiu před její implantací do děložní stěny. ESC jsou schopny sebeobnovy a jsou totipotentní – mohou produkovat specializované buňky všech 3 zárodečných listů, včetně buněk germinálních. ASC je nediferencovaná (nespecializovaná) buňka, jež se nachází v již funkčně specializovaných tkáních; je schopna sebeobnovy a diferenciace, aby produkovala specializované buněčné typy tkání, ve kterých se nachází. ASC jsou schopny sebeobnovy po dobu života organismu. Zdroje těchto kmenových buněk byly nalezeny v kostní dřeni, krvi, rohovce a sítnici oka, zubní pulpě, játrech, kůži, CNS, gastrointestinálním traktu, pankreatu a v dalších tkáních a orgánech. Na rozdíl od ESC nejsou známy ASC, které by byly schopny formovat všechny buňky těla.

3. Stručně o embryonálních kmenových buňkách

Embryonální kmenové buňky jsou definovány svým původem. Jsou odvozeny z embryí ve stadiu blastocysty, těsně před implantací do děložní sliznice. V tomto stadiu se např. preimplantační embryo myši skládá až ze 150 buněk. Tvoří je vrstva vnějších buněk (trofektoderm) obalující dutinu (blastocel) s vnitřní buněčnou masou, pozdějším primitivním ektodermem, ze kterého se embryonální kmenové buňky izolují.

Studie ESC odvozených z myši blastocysty se staly možnými před více než 20 lety s objevem techniky, jež umožnila tyto buňky množit in vitro a současně udržovat v nediferencovaném stavu. Kmenové buňky podobné embryonálním, nazývané embryonální germinální buňky (EGC), mohou být odvozeny od primordiálních germinálních buněk (buněk vyvíjejícího se plodu, z nichž se formují vajíčka a spermie) myši nebo člověka.

Absolutní univerzálnost, totipotence – tedy schopnost generovat diferencované buňky odvozené od všech 3 zárodečných vrstev embrya – ento-

dermu, mezodermu a ektodermu – činí ESC zcela unikátními. Jak vlastně víme, že tyto buňky jsou skutečně totipotentní? Kritéria založená na laboratorních testovacích metodách ESC odvozených od myšního embrya zahrnují 3 typy experimentů [35].

První test je prováděn injekcí již izolovaných ESC do blízkosti vnitřní buněčné masy blastocysty jiného myšního kmene. „Kombinované“ embryo je pak přeneseno do dělohy pseudogravidní myši. V případě, že se taková blastocysta implantuje a její další vývoj proběhne normálně, vznikne chiméra. Chimérismus je možné prokázat i ve vznikajících gonádách se zárodečnými buňkami, a ten je pak považován za konečný důkaz totipotence.

Druhou metodou je injekce ESC do dospělé myši (pod kůži nebo pouzdro ledviny) geneticky identické nebo imunodeficientní, takže ve tkáni nedojde k rejekci. V příjemci se buňky vyvíjejí v benigní tumory zvané teratomy. Při mikroskopické analýze těchto tumorů lze zjistit, že tumory obsahují buňky odvozené ze všech 3 zárodečných vrstev embrya, endodermu, mezodermu a ektodermu. Teratomy typicky obsahují gut-like-struktury, např. vrstvy epiteliálních buněk a hladkého svaly; příčně pruhovaný sval a myokard (který se může spontánně kontrahovat); nervovou tkáň; chrupavky a kosti; někdy i chlupy.

Třetí technikou je spontánní nebo cílená diferenciace myších ESC in vitro. Lze ji provést odnětím leukemického inhibičního faktoru (LIF), který napomáhá sebeobnově nediferencovaných ESC a zamezením adherence na povrch kultivačních misek. Během několika dní po změně kultivačních podmínek ESC agregují a tvoří tzv. embryoidní tělíska. Tělíska obsahují dobře organizované množství diferencovaných nebo částečně diferencovaných buněk odvozených od všech 3 zárodečných vrstev. Cíleně, různými změnami kultivačních podmínek, lze ESC diferenco-

vat do řady buněčných struktur. Např. myši ESC mohou tvořit in vitro vaskulární struktury, neurony uvolňující dopamin a serotonin, endokrinní ostrůvky pankreatu.

Technika kultivace myších ESC z vnitřní masy preimplantační blastocysty byla poprvé publikována před více než 20 lety [20,35] a různé modifikace této standardní procedury se dodnes používají v laboratorích celého světa. Je překvapující, že až do dnešního dne pouze 3 savčí druhy poskytly dlouhodobé kultury ESC schopných sebeobnovy: myš, opice a člověk.

Krátká historie výzkumu embryonálních kmenových buněk

Nová éra biologie embryonálních kmenových buněk začala v roce 1998, kdy James Thomson a jeho spolupracovníci uveřejnili metodu získání lidských ESC z vnitřní vrstvy lidské blastocysty produkované v rámci programů in vitro fertilizace (IVF) a darované pro účely výzkumu. Ve stejné době jiná skupina vedená Johnem Gearhartem publikovala získání linie buněk, které identifikovali jako embryonální zárodečné buňky odvozené z primordiálních zárodečných buněk 5 až 9 týdnů starých fetálních tkání z elektivních potratů.

Historie v datech:

1878 – první pokusy fertilizovat savčí vejce mimo tělo

1959 – první zvíře (králík) připravený technikou IVF ve Spojených státech

60. léta 20. století – studie teratokarcinomů varlat kmenů inbredních myši ukazují na jejich původ z embryonálních zárodečných buněk (embryonic germ cells, EGC); EGC byly označeny jako typ kmenových buněk

1968 – Edwards a Bavister fertilizují první lidské vejce in vitro

70. léta 20. století – embryonální buňky injektované do myši blastocysty produkují chimérickou myš [36]

1978 – Louise Brown, první IVF dítě, se narodilo v Anglii

1981 – Evans a Kaufman a současně Martin derivují myší embryonální kmenové buňky z vnitřní vrstvy blastocysty; injekce ESC do myší indukuje formaci teratomů [20,35]

1989 – Pera et al derivují klonální linie lidských embryonálních buněk, které vytvářejí tkáně ze všech 3 zárodečných listů; buňky jsou aneuploidní a jejich potenciál diferencovat se in vitro je limitován [46]

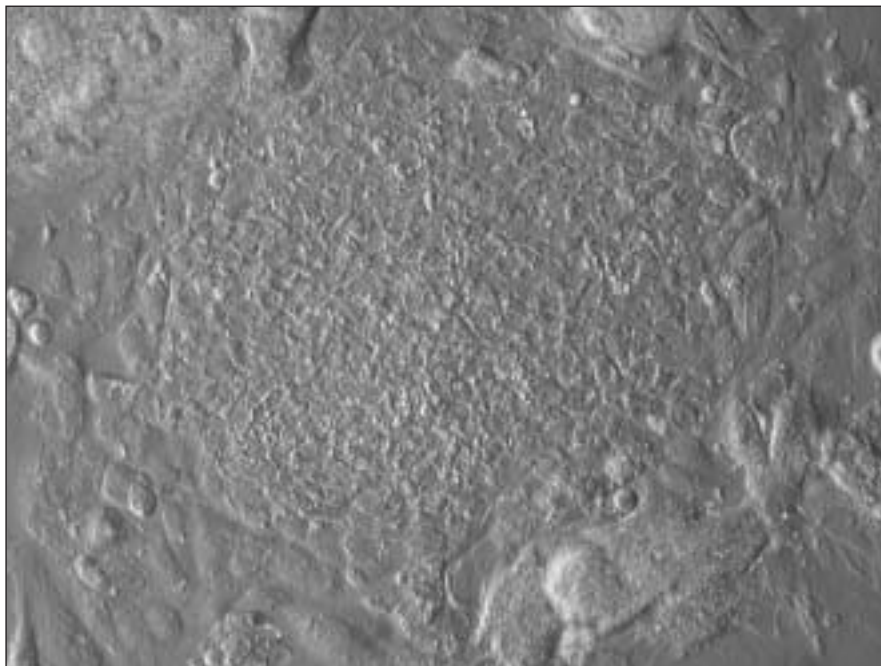
1995–1996 – ESC primátů jsou izolovány a udržovány in vitro, nejprve z vnitřní buněčné masy u makaků; tyto ESC mají normální karyotyp; jsou pluripotentní a diferencují se do buněk všech 3 zárodečných listů

1998 – Thomson et al izolují lidské ESC z vnitřní masy lidské blastocysty; buňky jsou kultivovány přes mnoho pasáží, zachovávají si normální karyotyp, udržují vysokou úroveň telomerázové aktivity a exprimují panel znaků typických pro ESC primátů [63]; Gearhart et al odvozují lidské EGC z gonadálního zářezu a mezenchymu 5 až 9 týdnů starých fetálních tkání; EGC nevytvářejí teratomy po injekci imunodeficitním myším

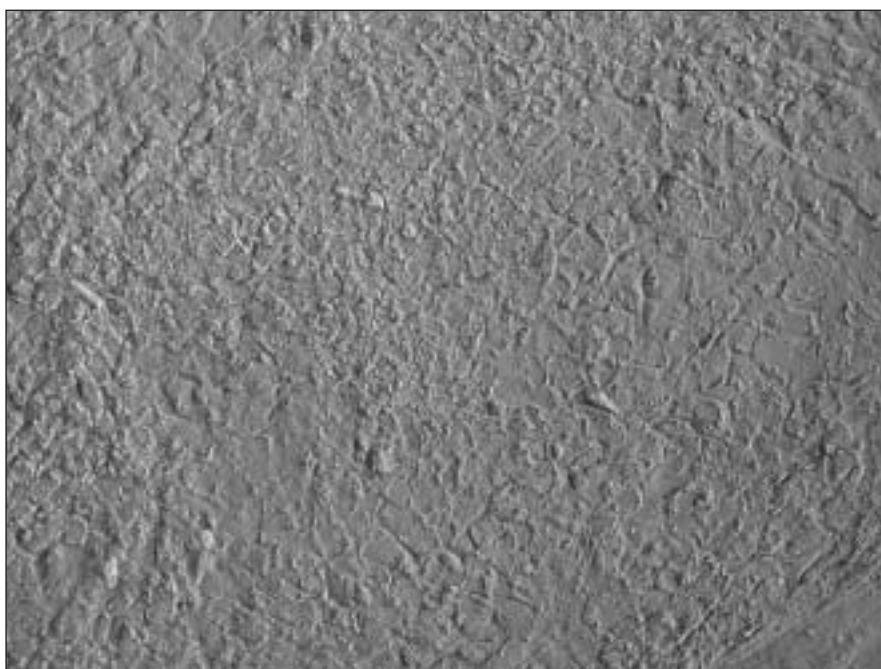
2001 – více výzkumných skupin popisuje metody přímé diferenciace ESC in vitro

Pluripotence lidských embryonálních buněk a EGC

Lidské ESC a EGC in vitro jsou schopny dlouhodobé sebeobnovy zachovávajíce normální karyotyp [6,51,56,63] a jsou schopny proliferace po řadu [43] dělení. Kultury odvozené od zárodečných buněk mají menší proliferativní kapacitu, většina proliferuje po 40. dělení; maximum je 70 až 80 dělení [53]. K dnešnímu dni potvrdilo několik laboratoří pluripotenci lidských ESC [6,27,51,53]. Testem pluripotence je in vivo injekce ESC imunodeficitním myším a jejich diferenciace do všech 3 zárodečných listů, jež zahrnují střevní epitel (odvozený z entodermu), hladký a příčně pruhovaný sval (odvozený z mezodermu), neuronální a vrstevnatý dlaždi-



Obr. 1. Počínající kolonie buněk primitivního ektodermu derivovaná z vnitřní buněčné masy lidské blastocysty.



Obr. 2. Rostoucí kolonie lidských embryonálních kmenových buněk linie CCTL6.

cový epitel (odvozené z ektodermu) [27,51,63].

Lidské ESC pro terapeutické účely

Nemoci, jež by mohly být léčeny pomocí lidských buněk odvozených od ESC, zahrnují Parkinsonovu nemoc, diabetes mellitus, traumatické po-

škození míchy, degeneraci Purkyňových buněk, Duchennovu muskulární dystrofii, srdeční selhání, osteogenesis imperfecta a další. Nicméně se zdá, že léčba těchto nemocí vyžaduje, aby se lidské ESC diferencovaly, alespoň částečně, do specifických buněčných typů před vlastní transplan-

tací. V současném stadiu vývoje jsou tedy léčebné procedury založené na použití lidských embryonálních kmenových buněk hypotetické a vysoce experimentální [29,43]. Jednou z výhod použití ESC ve srovnání s ASC je jejich prakticky neomezená kapacita proliferace in vitro a větší pravděpodobnost vytvoření širšího spektra buněčných typů při diferenciaci. Rovněž bude nezbytné prokázat optimální stav diferenciaci pro transplantaci a schopnost ESC přežít, integrovat se a fungovat v organismu příjemce. Potenciální nevýhody použití lidských ESC pro transplantace zahrnují schopnost nediferencovaných ESC indukovat tvorbu tumorů (teratomů).

Mnoho potenciálních aplikací lidských ESC se nachází také mimo transplantační výzkum, např. studium časných fází embryogeneze nebo nevysvětlené příčiny vrozených vad a placentárních abnormalit. Studium lidských ESC in vitro bude možné identifikovat genetické, molekulární a buněčné události vedoucí k těmto problémům a analyzovat metody k jejich prevenci [30,49]. Lidské ESC jsou kandidátem pro testování léků. Zvířecí modely nemohou vždy predikovat efekty léků na lidské buňky, proto by mohly být kultury lidských ESC zařazeny do preklinického testování. Lidské ESC mohou být dále použity pro vývoj nových metod genové terapie [49].

4. Somatické kmenové buňky

Dnes je zřejmé, že kmenové buňky se nacházejí ve více tkáních a orgánech, než se soudilo, a že tyto buňky jsou schopny diferenciaci do více buněčných typů, než jsme si dokázali dříve představit. Pluripotence buněk byla prokázána jak na experimentálním zvířecím systému [28], tak i v kultuře lidských buněk [50]. Velmi vzácně se vyskytující multipotentní dospělé progenitorové buňky (multipotent adult progenitor cell – MAPC) po aplikaci do myši blastocysty přispí-

vají podstatným dílem k vývoji většiny orgánů takto vzniklých chimérických zvířat.

Co jsou to somatické kmenové buňky? ASC tak jako všechny kmenové buňky sdílejí nejméně 2 charakteristiky: za prvé, schopnost sebeobnovy po dlouhé časové úseky (long-term self-renewal), za druhé, schopnost diferenciaci do zralých typů buněk s charakteristickou morfologií a specializovanou funkcí. Kmenové buňky typicky generují intermedieální buněčný typ, progenitorové a prekursorové částečně diferencované buňky, které teprve dávají vzniknout buňkám diferencovaným. Takové buňky jsou obvykle označovány jako „committed“ pro diferenciaci podle určité vývojové dráhy.

ASC jsou vzácné. Jejich primární funkcí je udržovat rovnovážný stav – homeostázu – a s jistým omezením nahrazovat v tkáni buňky, které odumírají pro poranění, ale především v důsledku přirozeného opotřebení. Například, odhadem pouze 1 z 10 000 až 15 000 buněk kostní dřeně je hematopoetická kmenová buňka [67]. Kromě toho jsou ASC rozptýleny po tkáních organismu a chovají se velmi rozdílně v závislosti na lokálním prostředí. Hematopoetické kmenové buňky jsou stále generovány v kostní dřeni, kde se diferencují ve zralé typy krevních buněk. Kmenové buňky v tenkém střevě jsou naproti tomu stacionární a jsou fyzicky separovány na bázi krypt od zralých buněk, které generují [58].

Na rozdíl od embryonálních kmenových buněk definovaných svým původem (vnitřní vrstva blastocysty) ASC nemají žádné takové charakteristiky. Nikdo ve skutečnosti nezná původ ASC ve zralých tkáních. Definice ASC přecházejí v odborné literatuře od jednoduchých popisů buněk až po striktní soubory experimentálních kritérií, která musí být splněna dříve, než může být buňka uznána jako kmenová. Nejvíce informací přichází o kmenových buňkách myši.

Seznam tkání, jež obsahují kmenové buňky, narůstá a dnes zahrnuje kostní dřev, periferní krev, mozek a míchu, zubní pulpu, krevní cévy, kosterní sval, epitel kůže a trávicího traktu, rohovku, retinu, játra a pankreas.

Aby mohly být klasifikovány jako ASC, musí být buňky schopny sebeobnovy po celou dobu života organismu. Toto kritérium lze jen těžko prokazovat in vivo, u člověka je to prakticky nemožné. ASC by rovněž měla být klonogenní. Jinými slovy, jedna ASC by měla být schopna regenerovat linii geneticky identických buněk, ze kterých vznikají diferencované tkáňové buňky. Tuto vlastnost je rovněž obtížné prokázat in vivo. Prakticky lze prokázat klonalitu in vitro a schopnost repopulace dané tkáně pomocí ASC. ASC by měla být schopna generovat plně diferencované buňky zralého fenotypu, plně integrované do dané tkáně, schopné specializovaných funkcí dané tkáně. Většina autorů spoléhá na 2 kritéria – morfolickou charakteristiku a průkaz, že diferencované buňky nesou znaky charakteristické pro danou tkáň.

Jak prokázat přítomnost ASC?

Existují 3 metody jak prokázat, že ASC může dát vzniknout specializovaným buňkám. ASC mohou být označeny in vivo a sledovány. Kandidátská ASC může být izolována a označena a pak transplantována do organismu. Nebo může být ASC izolována, kultivována in vitro a manipulována (růstovými faktory nebo geneticky), aby se diferencovala do zralých buněk.

Je však často obtížné, ne-li nemožné, rozlišit ASC od progenitorových buněk, které jsou částečně diferencované a dávají vzniknout plně diferencovaným buňkám. Tyto buňky se nacházejí v řadě orgánů a mají za úkol nahrazovat diferencovanější buňky a udržovat integritu tkáně. Progenitorové buňky již nejsou schopny vyvíjet se do všech typů buněk tkáně. Nejsou to tedy pravé ASC.

Plasticita somatických kmenových buněk

Není tomu dávno, kdy byla poprvé seriózně zvažována teorie, že ASC může generovat specializované buňky jiné tkáně – odvozené od stejného zárodečného listu nebo dokonce od jiného listu, (například hematopoetické kmenové buňky odvozené z mezodermy by mohly generovat příčně pruhovaný sval odvozený rovněž z mezodermy, ale také neurony odvozené z ektodermy). Toho času není formálně akceptována žádná terminologie tohoto jevu v odborné literatuře. Bývá označován jako plasticita (plasticity), neortodoxní diferenciace (unorthodox differentiation) nebo transdiferenciace (transdifferentiation).

Abychom mohli tvrdit, že ASC vykazují plasticitu, musíme nejprve prokázat, že buněčná populace existuje ve výchozí tkáni. Následně musíme prokázat, že ASC dávají vzniknout buněčným typům, které se normálně vyskytují v jiné tkáni. Dále je musíme sledovat v jejich novém prostředí, ať již in vitro, či in vivo, a prokázat, že označené ASC adoptovaly klíčové strukturální a biochemické charakteristiky nové tkáně, že se integrovaly do prostředí nové tkáně a mohou v ní přežít a fungovat jako původní zralé buňky tkáně.

Mnoho experimentů týkajících se plasticity zahrnuje kmenové buňky pocházející z kostní dřeně, odvozené od mezodermy. Kmenové buňky kostní dřeně se v experimentech diferencovaly do mezodermálně odvozených tkání, jako jsou kosterní sval [21,26,8], srdeční sval [32,44] nebo játra [3,33,62], ale i do nervové tkáně, jež vznikla z odlišného zárodečného listu ektodermy [13,39]. Recipročně byly nervové kmenové buňky diferencovány do hematopoetické linie [11].

Důkaz plasticity

Transplantované ASC in vivo musí prokázat, že se integrovaly do zralé hostitelské tkáně a přijaly přinejmenším některé z jejích vlastností

[13,21,32,39,44]. Mnohé pokusy zahrnují poranění určité tkáně jako model konkrétní nemoci člověka [11,33,44].

Většina studií, které prokazují plasticitu ASC, zahrnuje buňky, které jsou získány z kostní dřeně [13,21,33,39,47] nebo z mozku [11]. Studie plasticity prokazují předpoklad, že populace kmenových buněk v dospělých savcích nejsou fixované entity a že po vystavení novému prostředí mohou být schopny obsadit jiné tkáně a pravděpodobně se diferencovat do jiných druhů buněk. Není známo, do jaké míry se plasticita projevuje fyziologicky in vivo. Také není ještě jasné, jak, resp. zda tento jev může být využit k vytvoření tkání užitečných pro terapeutickou transplantaci [7,41].

5. Přehled hlavních typů somatických kmenových buněk**Somatické kmenové buňky nervového systému**

Před více než 30 lety Altman a Das prokázali, že 2 oblasti postnatálního mozku potkana, hippocampus a bulbus olfactorius, obsahují dělicí se buňky, ze kterých se staly neurony [4,5]. I přes tyto zprávy v té době převládal názor, že nervové buňky v dospělém mozku se nedělí. Až během posledních 5 let studie prokázaly, že se kmenové buňky vyskytují v mozku dospělých savců a že tyto buňky mohou vytvářet 3 hlavní buněčné typy – astrocyty a oligodendrocyty, jakož i neurony [24,38,57,61].

Kmenové buňky se ve fetálním a dospělém mozku dělí a umožňují vznik dalších kmenových, progenitorových a prekursorových buněk. Neuronální prekursory (neuroblasty) se dělí a umožňují vznik neuronů, gliové prekursory umožňují vznik astrocytů nebo oligodendrocytů. Astrocyty neuronům propůjčují mechanickou i metabolickou podporu, představují až 70 až 80 % buněk dospělého mozku, oligodendrocyty vytvářejí myelin. Za normálních

podmínek in vivo neuronální prekursorové neumožňují vznik gliových buněk a gliové prekursorové neumožňují vznik neuronů. Ačkoli je široce přijímán názor, že mozek dospělých savců obsahuje kmenové buňky, existuje nesoulad v tom, kolik je populací kmenových buněk CNS a jak fungují in vivo. Protože běžně nejsou známy znaky k identifikaci kmenových buněk in vivo, jediná metoda se zakládá na izolaci buněk a manipulaci s nimi in vitro [41].

I přes výše uvedené problémy byl dosud podán důkaz o 3 populacích kmenových buněk CNS. Jedna skupina je přítomna v mozkové tkáni vedle mozkových komor, oblasti ventrikulární zóny. Druhá skupina kmenových buněk dospělého CNS, popsána u myši, ale ne u člověka, se objevuje v pruhu tkáně, která obsahuje laterální mozkovou komoru, a v bulbu čichového nervu. Třetí možné umístění pro kmenové buňky u dospělých myši a v lidském mozku se nachází v hipokampu [19].

Kmenové buňky centrálního nervového systému v subventrikulární zóně

Kmenové buňky CNS, které obklopují laterální mozkové komory, jsou heterogenní a mohou být morfologicky odlišeny. V oblasti občas označované jako subependymální, přilehlé k vrstvě ependymálních buněk, je smíšená populace buněk, která sestává z neuroblastů, prekursorových buněk a astrocytů. Některé z buněk se dělí rychle, zatímco ostatní pomalu. Astrocyty, které se objevují v subventrikulární zóně mozku hlodavce, se mohou chovat jako nervové kmenové buňky. Studie ukazují, že populace buněk takto získaných z mozku dospělého hlodavce je schopna sebeobnovy a diferenciace do 3 hlavních typů buněk CNS [25,45,66].

Kmenové buňky centrálního nervového systému ve ventrikulární zóně

Další skupina potenciálních kmenových buněk CNS může sestávat

z ependymálních buněk [29]. Ependymální buňky lemující laterální mozkové komory byly popsány jako nedělící se buňky [18], které fungují jako část krevně mozkové bariéry. Alternativa, že ependymální buňky z ventrikulární zóny CNS jsou možná kmenové buňky, je tedy neočekávaná. Nicméně pomocí série pokusů s buňkami značenými bromdeoxyuridinem (BrdU) bylo dokázáno, že ependymální buňky se in vivo pomalu dělí a umožňují vznik populace progenitorových buněk v subventrikulární zóně [29].

Údaje naznačují, že ependymální buňky CNS (alespoň u dospělých hlodavců) mohou fungovat jako kmenové buňky. Buňky jsou schopny sebeobnovy a většinou proliferují asymetrickým dělením. Mnohé z ependymálních buněk CNS se nedělí (stav klidu), ale mohou být stimulovány in vitro (mitogeny) nebo in vivo (jako reakce na poranění). Po poranění umožňují ependymální buňky v míše pouze vznik astrocytů, ne neuronů. Jak a zda jsou ependymální buňky z ventrikulární zóny spřízněné s jinými kandidátskými populacemi kmenových buněk CNS, např. v hipokampu, není známo.

Zajímavé je, že mnohé geny identifikované v kultivovaných neurosférách byly také exprimovány v hematopoetických buňkách. Tento náález může pomoci interpretovat údaje, že buňky z mozku myši mohou umožnit vznik hematopoetických buněk u ozářených myší [11].

Kmenové buňky centrálního nervového systému v hipokampu

Hipokampus, z evolučního hlediska jedna z vývojově nejstarších částí mozkové kůry, je nositelem určitých forem paměti. Oblast hipokampu, v níž kmenové buňky pravděpodobně existují v mozku myši a člověka, je subgranulární zóna gyrus dentatus. Většina buněk označených bromdeoxyuridinem (BrdU) v hipokampu se objevuje vedle krevních cév. V lidském

gyrus dentatus exprimují některé buňky, označené BrdU, neuronově specifickou enolázu nebo calbindin, což jsou neuronové markery. Jiné buňky označené BrdU exprimují gliální fibrilární protein (GFAP), astrocytový marker. Studie analyzovala pitevni materiál nemocných rakovinou ve věku 57–72 let, kterým byl se souhlasem rodiny aplikován roztok BrdU. Pozitivita BrdU v analyzovaných neuronech naznačuje, že vytváření nových neuronů v hipokampu může pokračovat do pozdního věku [19].

Fetální kmenové buňky centrálního nervového systému

Mozek plodu obsahuje kmenové buňky, které mohou vytvářet všechny typy neuronů, astrocyty a oligodendrocyty, ale tato koncepce byla potvrzena teprve nedávno [15,50]. Nervové kmenové buňky v mozku plodu savců jsou soustředěny v 7 hlavních oblastech: v bulbu čichového nervu, ependymální (ventrikulární) zóně postranních komor, subventrikulární zóně (poblíž ependymální zóny), hipokampu, míše, mozečku a v mozkové kůře. Tyto buňky pravděpodobně představují různé populace kmenových buněk. Normální vývoj mozku závisí nejen na proliferaci a diferenciaci těchto kmenových buněk, ale také na programovaném procesu selektivní smrti buněk.

Experimentálně bylo připraveno kultivační bezsérové médium s faktory EGF a FGF2, v němž některé kmenové buňky CNS lidského plodu přežily, rozdělily se a vytvořily neurosféry. Neurosféry mohly být separovány a jednotlivé buňky pasážovány. Buňky pokračovaly v proliferaci a mohly být udržovány in vitro až 2 roky. V závislosti na kultivačních podmínkách mohly být buňky v neurosférách udržovány v nediferencovaném stavu, nebo cíleně diferencovány. Diferencované buňky většinou sestávaly z astrocytů (75 %), neuronů (13 %) a výjimečně z oligodendrocytů (1,2 %).

Kmenové buňky v kostní dřeni a krvi

Poznatek, že kostní dřeň obsahuje kmenové buňky, není nový. Jedna z populací buněk kostní dřene, hematopoetické kmenové buňky, je zodpovědná za vytvoření všech typů krevních buněk v těle. Tyto buňky byly identifikovány před více než 40 lety. Stromální buňky kostní dřene – smíšená populace buněk, která vytváří kost, chrupavku, vláknité pojivové tkáně a retikulární síť, jež podporuje tvorbu krevních buněk – byly popsány krátce nato [23]. Nyní častěji referované mezenchymální kmenové buňky kostní dřene také umožňují vznik těchto tkání a pravděpodobně představují stejnou populaci buněk jako stromální buňky kostní dřene. Nedávno byla izolována z cirkulující krve populace progenitorových buněk pocházejících z kostní dřene, která se diferencuje do endoteliálních buněk. Kostní dřeň obsahuje zřejmě 3 populace kmenových buněk – hematopoetické kmenové buňky, mezenchymální buňky a (pravděpodobně) endoteliální progenitorové buňky. Vzhledem k velkému experimentálnímu i klinickému významu jim autoři budou věnovat samostatný článek.

Endoteliální progenitorové buňky

Endoteliální buňky lemují vnitřní povrch krevních cév po celém těle. Prekurzorem hematopoetických a endoteliálních buněk jsou hypoteticky hemangioblasty, buňky mezodermálního původu. Důkaz jejich existence pochází až z výzkumu embryonálních kmenových buněk myši [64]. VEGF i fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) hrají důležitou roli v diferenciaci endoteliálních buněk in vivo [48].

Recentní práce ukazují, že kostní dřeň obsahuje buňky umožňující vznik nových krevních cév ve tkáních, které jsou ischemické [9,22,31,60]. Z těchto studií ale nevyplývá jasně, jaký druh buněk v kostní dřeni ovlivnil angiogenezu.

Progenitorové endoteliální buňky byly izolovány z periferní krve člověka pomocí protilátek proti CD34 a Flk-1, receptoru pro VEGF. Kultivované mononukleární buňky CD34⁺ a Flk-1⁺ přilnou k povrchu, nabudou větvenovitý tvar a vytvoří struktury připomínající krevní cévy. Po autologní transplantaci myším s indukovanou ischemií končetiny podporovaly CD34⁺ buňky vytváření nových krevních cév [9].

Kmenové buňky kosterního svalu

Kosterní sval, stejně jako myokard a hladký sval, pochází ze zárodečného mezodermu. Dosud byly identifikovány 3 populace kmenových buněk kosterního svalu: satelitní buňky, buňky ve stěně dorzální aorty a tzv. *side population* buňky. Satelitní buňky v kosterním svalu byly identifikovány před 40 lety u žab pomocí elektronové mikroskopie [37] a posléze u savců.

Satelitní buňky se objevují na povrchu zralé svalové buňky, myofibrily. U dospělých savců satelitní buňky zprostředkovávají růst svalu [54]. Přestože jsou satelitní buňky normálně stacionární, mohou být podníceny k proliferaci, např. v důsledku zranění nebo cvičení. Za těchto okolností umožňují satelitní buňky vznik myogenních prekursorových buněk, které se pak diferencují do myofibril.

Zda jsou satelitní buňky kosterního svalu právě kmenové buňky nebo prekursorové buňky, či byly jediným druhem buněk, který regeneruje kosterní sval, není zcela jasné. Kmenové buňky svalu byly také objeveny v dorzální aortě zárodků myši a vytvářejí buňky, které umožňují vznik svalových satelitních i endoteliálních buněk. Zda vyhovují buňky dorzální aorty kritériím sebeobnovujících svalových kmenových buněk, je předmětem diskuse [16].

Jiný typ kmenové buňky, nazvaný *side population*, která také regeneruje kosterní sval, může být přítomna ve

svalu a v kostní dřeni. *Side population* je populace buněk, která byla separována pomocí *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Poté, co byly tyto buňky vpraveny intravenózně mdx-myším (model Duchennovy svalové dystrofie), obnovily expresi dystrofínu [26]. Závěrem lze konstatovat, že kmenové nebo progenitorové buňky z různých tkání odvozených z mezodermu mohou být schopny regenerovat kosterní sval.

Epiteliální buněčné prekuzory v kůži a trávicím systému

Epiteliální buňky, které představují 60 % diferencovaných buněk v organizmu, jsou zodpovědné za pokrytí vnitřního a vnějšího povrchu těla, včetně tělních dutin. Epiteliální buňky v kůži a zažívacím traktu jsou neustále nahrazovány. Populace buněk, která obnovuje epitel tenkého střeva, se nachází ve střevních kryptách. Některé kryptové buňky se často považují za kmenové buňky; jedna z nich může umožnit vznik celého organizovaného shluku buněk [58].

Kůže savců obsahuje nejméně 3 populace epiteliálních buněk: epidermální buňky, buňky vlasových folikulů a žlázné epiteliální buňky, např. ty, které tvoří potní žlázy. Ve všech 3 kompartmentech lze předpokládat výskyt kmenové buňky. Populace kmenových buněk kůže se objevuje v bazální vrstvě epidermis. Tyto kmenové buňky proliferují v bazální vrstvě a pak se diferencují, když se pohybují směrem k vnějšímu povrchu kůže. Keratinocyty v nejhornější vrstvě postrádají jádra a chovají se jako ochranná bariéra. Kmenová buňka kůže se dělí asymetricky a produkuje 2 druhy dceřiných buněk: jeden představuje další kmenovou buňku, schopnou sebeobnovy, druhý střední prekursorovou buňku, která se diferencuje do keratinocytů. Kmenové buňky schopné sebeobnovy mohou být odlišeny od středních prekursorových buněk svou vyšší úrovní exprese integrinu $\beta 1$.

Kmenové buňky ve slinivce břišní a v játrech

Role kmenových buněk ve zralé slinivce břišní a v játrech je zatím nejasná. Během embryonálního vývoje vznikají obě tkáně z endodermu. Výsledky experimentů ukazují, že jediná prekursorová buňka získaná ze zárodečného endodermu se může diferencovat v buňky pankreatu a jater [17]. U dospělých savců obsahují pankreas i játra mnoho druhů diferencovaných buněk, které mohou být regenerovány více druhy kmenových buněk. Buňky pankreatu s endokrinní sekrecí v Langerhansových ostrůvcích zahrnují β -buňky produkující inzulin, α -buňky produkující glukagon a buňky uvolňující somatostatin a pankreatický polypeptid. Existence kmenových buněk v pankreatu se předpokládá v pankreatických vývodech nebo v ostrůvcích samotných. Některé práce ukazují, že kmenové buňky exprimující nestin (obvykle pokládáný za znak nervových kmenových buněk) mohou regenerovat všechny druhy buněk v ostrůvcích pankreatu [34,70].

Identita kmenových buněk repopulujících játra je rovněž otázkou. Nedávné studie naznačují, že hematopoetické kmenové buňky mohou být schopny osídlit poškozená játra a diferencovat se v hepatocyty [33,48,62]. Zbývá však otázka, zda buňky z kostní dřeni fyziologicky tvoří hepatocyty *in vivo*. Není známo, zda tento typ plasticity se vyskytuje rovněž bez závažného poškození jater [54,64]. Samotné hepatocyty jsou rovněž zodpovědné za dobře známou regenerační kapacitu jater.

Co víme o somatických kmenových buňkách?

Somatické kmenové buňky mohou proliferovat, nebo také ne, bez diferenciací po dlouhou dobu (vlastnost dlouhodobé sebeobnovy) a mohou umožnit vznik zralých druhů buněk, které mají charakteristické tvary a specifické funkce. Somatické kme-

nové buňky jsou vzácné. Je často obtížné je identifikovat a jejich původ je neznámý. Současné metody pro charakterizaci somatických kmenových buněk závisí na markerech povrchu buněk a pozorováních týkajících se jejich diferenciacních vzorců in vitro.

Recentně publikovaná vědecká literatura uvádí, že somatické kmenové buňky byly získány z mozku, kostní dřeni, periferní krve, zubní pulpy, míchy, krevních cév, kosterního svalu, epitelů kůže a zažívacího systému, rohovky, sítnice, jater a pankreatu; tudíž somatické kmenové buňky byly nalezeny v tkáních, které se vyvíjejí ze všech 3 embryonálních zárodečných listů. Hematopoetické kmenové buňky z kostní dřeni jsou studovány nejvíce a jsou používány pro klinické aplikace v rámci transplantace kostní dřeni. Existují přinejmenším 2 další populace somatických kmenových buněk, které byly identifikovány z kostní dřeni a krve. Několik populací kmenových buněk bylo identifikováno v mozku. Existují mnohé studie o somatických kmenových buňkách v jiných tkáních (sval, krev a tuk), které vykazují plasticitu. Velmi málo publikovaných výsledků o plasticitě kmenových buněk ovšem zahrnovalo průkaz klonality. Existuje tedy omezený důkaz, že jediná somatická kmenová buňka nebo geneticky identická linie somatických kmenových buněk vykazuje plasticitu. Zřídka prokázaly pokusy týkající se plasticity, že somatické kmenové buňky vytvořily vyztřelé, plně funkční buňky nebo že buňky obnovily ztracenou funkci in vivo.

Co potřebujeme vědět o somatických kmenových buňkách?

Jaké jsou zdroje somatických kmenových buněk v organismu? Jsou to „zbytky“ embryonálních kmenových buněk, nebo vznikají nějakým jiným způsobem? Pokud je pravdivý druhý názor, jak tedy somatické kmenové buňky vznikají a proč zůstávají v ne-

diferencovaném stavu, když se všechny buňky kolem diferencovaly? Je možné manipulovat se zralými kmenovými buňkami, aby se zvýšila jejich schopnost proliferovat in vitro, takže somatické kmenové buňky mohou být použity jako dostatečný zdroj tkáně pro transplantáty? Kolik druhů somatických kmenových buněk existuje a ve kterých tkáních existují? Co je nejlepším důkazem, že somatické kmenové buňky vykazují plasticitu a tvoří druhy buněk jiných tkání? Existuje univerzální kmenová buňka? Objevil se názor, že u dospělých savců může existovat populace „univerzálních“ kmenových buněk. Přestože je tento názor široce teoretický, má jistý experimentální základ. Potenciální univerzální somatická kmenová buňka může být jedna, která obíhá v krevním řečišti, může z krve uniknout a osadit různé zralé tkáně. Ve více než jednom experimentálním systému si experimentátoři všimli, že dělíci se buňky ve zralých tkáních se často objevují poblíž krevních cév, jak je tomu u kmenových buněk v hipokampu. Projevují somatické kmenové buňky plasticitu jako normální vlastnost in vivo? Pokud ano, je tohle pravda u všech somatických kmenových buněk? Jaké jsou signály regulující proliferaci a diferenciaci kmenových buněk, které projevují plasticitu?

Jak se zdá, nezodpovězených otázek zůstává stále ještě mnoho.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA č. NC7493-1/2003.

Literatura

1. Akashi K, Traver D, Kondo M et al. Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 1999; 69: 217–226.
2. Akashi K, Traver D, Miyamoto T et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193–197.
3. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.

4. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; 124: 319–335.
5. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969; 137: 433–457.
6. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227: 271–278.
7. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7: 393–395.
8. Andrews PW, Damjanov I, Simon D et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1984; 50: 147–162.
9. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
10. Bianco P, Riminucci M, Kuznetsov S et al. Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expr* 1999; 9: 159–173.
11. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283: 534–537.
12. Bongso A, Fong CY, Ng SC et al. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9: 2110–2117.
13. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775–1779.
14. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660–1663.
15. Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 1994; 372: 263–266.
16. De Angelis L, Berghella L, Coletta M et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic

- markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999; 147: 869–877.
17. Deutsch G, Jung J, Zheng M et al. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 2001; 128: 871–881.
18. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5046–5061.
19. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313–317.
20. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154–156.
21. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Colletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528–1530.
22. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97: 1108–1110.
23. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381–390.
24. Gage FH, Coates PW, Palmer TD et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11879–11883.
25. Gritti A, Parati EA, Cova L et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996; 16: 1091–1100.
26. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390–394.
27. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88–95.
28. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41–49.
29. Johansson CB, Momma S, Clarke DL et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25–34.
30. Jones JM, Thomson JA. Human embryonic stem cell technology. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 219–223.
31. Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422–3427.
32. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430–436.
33. Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229–1234.
34. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P et al. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science* 2001; 292: 1389–1394.
35. Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 7634–7638.
36. Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 1980; 209: 768–776.
37. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493–495.
38. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; 276: 66–71.
39. Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779–1782.
40. Mokry J, Karbanová J, Osterreicher J. Experimental brain injury induces activation of neural stem cells in the forebrain subependyma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11: 161–167.
41. Morrison SJ, White PM, Zock C et al. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 1999; 96: 737–749.
42. Nagy A, Rossant J, Nagy R et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 8424–8428.
43. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193–204.
44. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701–705.
45. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 1997; 8: 389–404.
46. Pera MF, Cooper S, Mills J et al. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 1989; 42: 10–23.
47. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168–1170.
48. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 2001; 220: 1–17.
49. Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM et al. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 31–47.
50. Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98(9): 2615–2625.
51. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399–404.
52. Reynolds BA, Weis S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707–1710.
53. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307–11312.
54. Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 1996; 175: 84–94.
55. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50: 3811–3815.
56. Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 113–118.
57. Shihabuddin LS, Palmer TD, Gage FH. The search for neural progenitor

cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease. *Mol Med Today* 1999; 5: 474–480.

58. Slack JM. Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science* 2000 287: 1431–1433.

59. Sykova E, Roitbak T, Mazel T et al. Astrocytes, oligodendroglia, extracellular space volume and geometry in rat fetal brain grafts. *Neuroscience* 1999; 91: 783–798.

60. Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434–438.

61. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 135–141.

62. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11–16.

63. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145–1147.

64. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* 1993; 142: 1331–1333.

65. Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* 1998; 92: 2609–2612.

66. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD et al. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 1993; 11: 951–966.

67. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157–168.

68. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92–96.

69. Zandstra PW, Lauffenburger DA, Eaves CJ. A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 1215–1222.

70. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521–533.

MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

www.fnbrno.cz

e-mail: mklabus@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 29. 12. 2003

Přijato po recenzi: 22. 3. 2004

www.kardiologickarevue.cz