

INTESTINALNE MATIČNE ĆELIJE

Sanja Bojić, Bojana Simović Marković, Ana Volarević, Miodrag Stojković
Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

INTESTINAL STEM CELLS

Sanja Bojic, Bojana Simovic Markovic, Ana Volarevic, Miodrag Stojkovic
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Tkivo koje najbrže proliferiše u organizmu je epitel gastrointestinalnog trakta. Sve terminalno diferencijirane ćelije intestinuma potiču od iste populacije multipotentnih ćelija koje se nalaze unutar intestinalnih kripti. U literaturi se pominju dva osnovna modela pozicije matičnih ćelija unutar intestinalnih kripti, model „+4 pozicije“ prema kom se matične ćelije nalaze neposredno iznad Panetovih ćelija i model „stem ćelijske zone“ prema kom se matične ćelije nalaze između samih Panetovih ćelija, dok ćelije iznad Panetovih predstavljaju njihove direktne potomke. Do sada je identifikovano više različitih markera intestinalnih matičnih ćelija, ali nijedan od njih nije specifičan isključivo za intestinalne matične ćelije što otežava njihovu identifikaciju i izolaciju. Svrha ovog članka je revizija dosadašnjih saznanja i literature o markerima, nišama, izolaciji i kultivaciji intestinalnih matičnih ćelija.

Ključne reči: stem ćelije; gastrointestinalni trakt; biološki markeri.

UVOD

Tkivo koje najintenzivnije proliferiše u organizmu je epitel gastrointestinalnog trakta. Obnavljanje intestinalnog epitela je konstantan proces pri čemu celokupni epitel biva zamenjen u roku od tri do četiri dana (1). Ovaj proces regulisan je multipotentnim matičnim ćelijama sposobnim da stvaraju sve tipove ćelija intestinalnog trakta.

Intestinalni trakt se anatomski sastoji iz dva segmenta: tankog creva i debelog creva (kolona). Histološki mukoza intestinalnog trakta čini jednoslojni cilindrični epitel. U tankom crevu epitel formira prstolike invaginacije tzv. intestinalne ili Lieberkuhnove kripte i prstolike protruzije – resice, *villi intestinales*. U kolonu nema resica, ali je organizacija epitela slična, s kriptama koje sežu duboko u mukoza.

Crevni epitel sadrži četiri tipa terminalno diferencijiranih ćelija: apsorptivne ćelije, peharaste ćelije, enteroendokrine ćelije i Panetove ćelije. U tankom crevu najbrojnije su apsorptivne ćelije, cilindričnog oblika, s mikrovilama na apikalnoj površini koje imaju ulogu u sekreciji koktela hidrolitičkih enzima u lumen creva i apsorpciji hrane. Ostala tri tipa ćelija su sekretorne ćelije. Peharaste ćelije sekretuju mukus i apikalni deo njihove citoplazme obično je prepun i distendiran sekretornim

ABSTRACT

The mucosa of the gastrointestinal tract is the most rapidly proliferating tissue in the body. All four differentiated intestinal cell lineages originate from a population of multipotent stem cells located within the intestinal crypts. There are two opposing models of the position of stem cells within the intestinal crypts in the literature, the “+4 position” model and the “stem cell zone” model. In the “stem cell zone” model the stem cells are intermingled with the Paneth cells while the “+4 position” model places the stem cells just above the Paneth cells at the +4 position. Up to date, different intestinal stem cell markers have been identified, but the lack of unique markers has hampered the definitive identification of intestinal stem cells. This review provides an overview of the current status of knowledge about markers, niche, isolation and cultivation of the intestinal stem cells.

Key words: stem cells; gastrointestinal tract; biological markers.

granulama ispunjenih mukusom. Broj peharastih ćelija se povećava od proksimalnog ka distalnom kraju intestinuma. Enteroendokrine ili neuroendokrine ćelije kojih ima više vrsta sitnije su i sekretuju različite intestinalne hormone (kateholamine i peptide) sa endokrinim ili parakrinim dejstvom. Panetove ćelije se nalaze na samom dnu kripti u tankom crevu i ascendentnom delu kolona i luče antibakterijske proteine (lizozim i kriptidin ili defenzine).

Prema tzv. unitarnoj hipotezi, koju su postavili Cheng i Leblond 1974. godine, sve ćelije intestinalnog trakta potiču od iste populacije matičnih ćelija, tada nazvanih cilindričnim ćelijama baze kripti (eng. crypt-based columnar cells, CBC) (2). U eksperimentima tokom kojih su navedene ćelije obeležene tricijum timidinom pokazano je da se nakon određenog vremena tricijum timidin nalazi u svim terminalno diferencijiranim ćelijskim tipovima (2). Takođe je pokazano da intestinalne matične ćelije poseduju sposobnost da regenerišu kompletnu populaciju ćelija epitela kripti i vilusa nakon citotoksičnog tretmana. Naime, posle četiri dana od ozračivanja ćelije kripti podležu apoptozi i kripte gotovo u potpunosti nestaju. Ostaci kripti mogu se identifikovati jedino pomoću preostalih Panetovih ćelija koje su radiorezistentne. Međutim, pokazano je da je preživljavanje jedne ili više klonogenih ćelija omogućilo očuvanje kripti, jer su iz ovih

ćelija potom ponovo nastali svi ćelijski tipovi crevnog epitela čime su kripte u potpunosti regenerisane (3).

INTESTINALNE NIŠE

Matične ćelije intestinalnog trakta smeštene su, kao i ostale matične ćelije, unutar niša koje sadrže različite ćelijske tipove, ekstracelularni matriks i faktore rasta. Niše predstavljaju jedinstvenu mikrosredinu koje s jedne strane omogućavaju očuvanje multipotentnosti matičnih ćelija a s druge strane njihovu diferencijaciju u progenitorske ćelije.

Multipotentne matične ćelije intestinuma smeštene su unutar kripte. Intestinalne kripte se nalaze u lamini proprijii unutar fenestrovanih omotača sačinjenog od intestinalnih subepitelijalnih miofibroblasta (eng. intestinal subepithelial myofibroblasts, ISEMF) koji igraju ključnu ulogu u epitelno-mezenhimalnoj interakciji. Naime, ISEMF proizvode faktor rasta hepatocita, transformišući faktor rasta β i faktor rasta keratinocita (4). Receptori za ove faktore rasta nalaze se na epitelijalnim ćelijama pa su ISEMF od ključnog značaja za regulaciju ćelijske diferencijacije (4).

Iako se ISEMF najčešće povezuju s regulacijom intestinalnog epitela, jasno je da one nisu jedine ćelije unutar intestinalnih niša, već da mnogobrojni faktori i ćelijski tipovi imaju ulogu u regulaciji intestinalnog epitela. Na primer, pokazano je da se u intestinalnim nišama nalazi više tipova SMA (eng. smooth muscle actin) pozitivnih mezenhimalnih ćelija koje takođe mogu imati ulogu u regulisanju funkcije crevnog epitela (5). Panetove ćelije takođe učestvuju u očuvanju i regulaciji funkcije matičnih ćelija, što su pokazali Sato i saradnici u eksperimentima sa Lgr5⁺ ćelijama (6). *In vitro* kokultivacijom Lgr5⁺ intestinalnih matičnih ćelija sa Panetovim ćelijama stimulirana je proliferacija ćelija pa je zapažen znatno veći broj epitelijalnih struktura, organoida, u odnosu na samostalnu kultivaciju Lgr5⁺ ćelija (6).

Matične ćelije creva nalaze se u dnu kripte, blizu njihove baze, odmah iznad Panetovih ćelija i između samih Panetovih ćelija. Iznad njih u kriptama se nalaze ćelije u prolaznoj amplifikaciji (progenitori koji se dele, neki od njih već delimično diferencirani), a iznad progenitora, u vratu kripte i na vilusima, leže postmitotičke diferencirane ćelije (7). Tokom proliferacije i diferencijacije ćelija u kriptama dolazi do njihove migracije naviše ka vratu kripte i vrhovima vilusa, da bi na kraju došlo do njihove deskvamacije s vrhova resica u lumen creva. Izuzetak čine jedino Panetove ćelije, smeštene na samom dnu kripte, koje migriraju naniže nakon što se diferenciraju. Šablon migracije prvi put je pokazan eksperimentima sa ćelijama obeleženim tricijum timidinom (2).

U literaturi se pominju dva osnovna modela pozicije matičnih ćelija unutar niša, model tzv. „+4 pozicije“ i „stem ćelijske zone“. Od kasnih pedesetih godina prošlog veka u upotrebi je model „+4 pozicije“, prema kome matične ćelije leže blizu samog dna kripte, na tzv. +4 poziciji, gde su prve tri pozicije okupirane terminalno diferentovanim Panetovim ćelijama. Prisustvo ovih ćelija prvi je eksperimentalno potvrdio Cris Potten sa saradnicima (8). Isti tim je pokazao ekstremnu osetljivost ovih ćelije na dejstvo radijacije (9).

Drugi model, model „stem ćelijske zone“, našao je uporište u otkriću pre više od 30 godina tzv. crypt-based columnar cells, CBC, između Panetovih ćelija na samom dnu kripte (2). Po teoriji Leblonda i saradnika, koji su postavili ovaj model, CBC bi trebalo da predstavljaju „prave“ stem ćelije čiji su direktni potomci ćelije odmah iznad Panetovih ćelija (na +4 poziciji po drugom modelu) ili prema istim autorima tzv. miks ćelije (2).

U skorije vreme Garrison sa saradnicima predlaže da se region Panetovih ćelija označi kao donja zona matičnih ćelija (eng. lower stem cell zone, LSZ), a region 1–4 ćelija iznad Panetovih ćelija kao gornja zona matičnih ćelija (eng. upper stem cell zone, USZ) (10). Smatra se da ćelije u USZ predstavljaju mirnu, rezervnu populaciju dok su ćelije u LSZ aktivne i brže se umnožavaju (11, 12).

MARKERI INTESTINALNIH MATIČNIH ĆELIJA

Prvi marker identifikovan u intestinalnim matičnim ćelijama je Musashi-1 (Msh-1), RNK vezujući protein, homolog *Drosophila* proteinu kod sisara. Ekspimiran je u ćelijama kako USZ tako i LSZ (13, 14). Prisustvo Msh-1 dokazano je i u nervnim matičnim ćelijama u kojima najverovatnije ima ulogu u asimetričnoj deobi senzornih nervnih prekursora (15).

Barker i saradnici otkrili su Lgr5 (receptor vezan za G protein), jedinstveni stem ćelijski marker u mišijem tankom crevu i kolonu, ekspimiran u kolumnarnim matičnim ćelijama u bazi kripte (16). Prisustvo ovog stem ćelijskog markera pokazalo je da se kolumnarne ćelije u bazi kripte razlikuju od +4 kolumnarnih ćelija. Lgr5⁺ ćelije nisu specifične samo za inestinum već se nalaze i u drugim tkivima. Biološka funkcija Lgr5 u intestinalnim matičnim ćelijama još uvek nije poznata.

U skorije vreme otkriveno je prisustvo još jednog ćelijskog markera Ascl2, transkripcionog faktora Achaete Scute-Like 2, takođe ekspimiranog u Lgr5⁺ stem ćelijama (17). Za razliku od Lgr5, ovaj marker se ispoljava isključivo u matičnim ćelijama tankog creva i kolona.

Sangiorgi je 2008. godine sa svojim timom opisao još jedan marker matičnih ćelija intestinuma, Bmi1. Eksperimentalno je dokazano da Bmi1 + stem ćelije takođe mogu dati sva četiri ćelijska tipa prisutna u tankom crevu. Ekspresija Bmi1 ograničena je na proksimalni deo

tankog creva, i to uglavnom na ćelije smeštene u USZ, +4 kolumnarne ćelije (12).

Nekolicina drugih markera identifikovana je u +4 ćelijama: phospho-PTEN i phospho-AKT, sFRP5, Sox4 i Dcamk11 (18–21). Svi ovi markeri specifični su za ćelije na +4 poziciji.

Površinski ćelijski markeri mogu se takođe koristiti kao markeri za identifikaciju. U intestinumu, epitelne ćelije pričvršćene su za bazalnu membranu interakcijom integrina epitelne površine i kolagena, fibronektina i laminina bazalne membrane. Povišena ekspresija $\beta 1$ i $\alpha 2$ integrina dokazana je u proliferativnom bazalnom i srednjem regionu kripti kolona i tankog creva (22, 23).

SIGNALNI PUTEVI U INTESTINUMU

Mnogi signalni putevi učestvuju u regulaciji razvoja, proliferacije i diferencijacije gastrointestinalnog trakta. Unutar epitela komunikacija između ćelija ostvaruje se preko Wnt, Notch i Eph/ephrin signalnog puta. Mutacije koje zahvataju komponente ovih signalnih puteva dovode do poremećene distribucije ćelijskih tipova duž osovine kripti–vilus (7).

Odavno je poznato da modeliranje intestinalnog epitela zavisi od epitelno-mezenhimalne interakcije, ali su tek u skorije vreme utvrđeni signalni putevi od ključnog značaja za ovu interakciju. Hedgehog, PDGF (eng. platelet-derived growth factor) i BMP (eng. bone morphogenetic protein) signalni putevi predstavljaju glavne medijatore ove dvosmerne komunikacije. Mutacije koje utiču na ove signalne puteve remete formiranje kripti i resica (7).

Smatra se da ključnu ulogu u razvoju gastrointestinalnog trakta imaju Wnt i BMP signalni putevi. Pojednostavljeno rečeno aktivacija Wnt signalnog puta stimuliše proliferaciju intestinalnih matičnih ćelija, dok aktivacija BMP signalizacije održava iste populacije ćelija u stanju mirovanja (18, 24).

IZOLACIJA I KULTIVACIJA INTESTINALNIH MATIČNIH ĆELIJA

Sato i saradnici su pokazali da se Lgr5+ ćelije mogu izolovati iz kripti miša, izdvojiti protočnom citometrijom, a zatim kultivisati u vidu pojedinačnih ćelija u prisustvu Matrigela, EGF-a, Noggina i R-spondina-1 (Wnt agoniste). Kultivacijom u navedenim uslovima dolazi do stvaranja tzv. organoidnih jedinica sferičnog oblika sa unutrašnjom luminalnom strukturom, resicama i kriptama u kojima su prisutne Lgr5+ ćelije (25). Dalje analize dokazale su prisustvo gobletovih, Panetovih i enteroendokrinih ćelija u svakom organoidu. Iako su ovi organoidi rasli u odsustvu strukturalnog mezenhima, neki od dodatih kofaktora sintetisani su upravo od strane mezenhima (26).

Sato i saradnici su takođe pokazali da kokultivacija Lgr5+ ćelija sa FACS-om sortiranim CD24+ Panetovim ćelijama signifikantno poboljšava *in vitro* formiranje organoida, što sugeriše da su Panetove ćelije deo intestinalne stem ćelijske niše (6).

ZAKLJUČAK

Poslednjih godina postignut je veliki napredak u razumevanju intestinalnih matičnih ćelija. Ipak, mnoga ključna pitanja još uvek su bez odgovora. Kako bi se omogućila klinička primena ovih ćelija u tretmanu hroničnih intestinalnih oboljenja neophodno je najpre utvrditi metode za adekvatnu identifikaciju i izolaciju matičnih ćelija iz crevnog epitela i definisati uslove za kultivaciju ćelija kako bi se postigla njihova ekspanzija i dobijanje adekvatnog broja ćelija za kliničku aplikaciju. Takođe, od vitalnog je značaja pronaći efikasne metode transplantacije matičnih ćelija kako bi se na najbolji mogući način sproveo tretman kod osoba koje boluju od hroničnih oboljenja intestinalnog trakta.

SKRAĆENICE

- CBC – cilindrične ćelije baze kripti
ISEMF – intestinalni subepitelni miofibroblasti
Lgr5 – engl. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*
LSZ – donja zona matičnih ćelija
USZ – gornja zona matičnih ćelija

LITERATURA

1. Lipkin M. Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol* 1985; 47: 175–97.
2. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974; 141: 537–61.
3. Potten CA, Hendry JH. Differential regeneration of intestinal proliferative cells and cryptogenic cells after irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1975; 27: 413–24.
4. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277(2 Pt 1): C183–201.
5. Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G684–96.

6. Sato T, Van EIJH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr-5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011; 469: 415–8.
7. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 349–59.
8. Potten CS, Kovacs L, Hamilton E. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet* 1974; 7: 271–83.
9. Potten CS. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* 1977; 269: 518–21.
10. Garrison AP, Helmrath MA, Dekaney CM. Intestinal stem cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 2–7.
11. Scoville D, Sato T, He X, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 2008; 134: 849–64.
12. Sangiorgi E, Capecchi MR. *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 2008; 40: 915–20.
13. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, et al. Candidate markers for stem and early progenitor cells, *Musashi-1* and *Hes1*, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 2003; 535: 131–5.
14. Potten CS, Booth C, Tudor GL, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation* 2003; 71: 28–41.
15. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T. Function of RNA-binding protein *Musashi-1* in stem cells. *Exp Cell Res* 2005; 306: 349–56.
16. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449: 1003–7.
17. Van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, et al. Transcription factor *Achaete Scute-Like 2* controls intestinal stem cell fate. *Cell* 2009; 136: 903–12.
18. He XC, Zhang J, Tong WG, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat Genet* 2004; 36: 1117–21.
19. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005; 129: 626–38.
20. Van der Flier LG, Sabates Bellver J, Oving I, et al. The intestinal Wnt/TCF signature. *Gastroenterology* 2007; 132: 628–32.
21. Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, et al. Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches. *J Biol Chem* 2006; 281: 11292–300.
22. Fujimoto K, Beauchamp RD, Whitehead RH. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 2002; 123: 1941–8.
23. Beaulieu JF. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* 1992; 102(Pt 3): 427–36.
24. Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem cell compartments in the small intestine of mice lacking *Tcf-4*. *Nat Genet* 1998; 19: 379–83.
25. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459: 262–5.
26. Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, Nagy N, Roberts DJ. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev* 2005; 122: 821–33.