

Liečebné možnosti kmeňových buniek

MUDr. Martina Vidová, MUDr. Lucia Lakyová, PhD., prof. MUDr. Jozef Radoňak, CSc.

I. chirurgická klinika LF UPJŠ a UN L. Pasteura, Košice

Transplantácia kmeňových buniek za účelom urýchlenia hojenia je čoraz častejšie aplikovaná v klinických štúdiách. U niektorých pacientov prináša výrazný benefit oproti štandardnej liečbe. Napriek aplikácii tejto metódy v praxi doteraz nie sú opísané výrazné vedľajšie účinky a komplikácie a dosiaľ nám nie sú jasné všetky mechanizmy a efekty liečby. Práca sa zaoberá súčasnou úrovňou poznania a aplikácie kmeňových buniek v liečbe. V práci sú opísané charakteristické vlastnosti kmeňových buniek a bunkovej terapie, ich funkcie, rôzne spôsoby izolácie kmeňových buniek a ich využitie v rôznych odvetviach medicíny.

Kľúčové slová: kmeňové bunky, bunková terapia, regenerácia.

The use of stem cells for therapy

Transplantation of stem cells of enhancement healing is frequently used in clinical studies nowadays. It brings great benefit compare to standard treatment in few cases. Despite of application of this method in praxis, there are not described side effects and complications. All of the mechanism and effects of this treatment are not clear. The article describes level of knowledge and application of stem cells in treatment. The article entertains about specific facilities of stem cells and cell therapy, their function, different ways of isolation and their use in different fields of medicine.

Key words: stem cells, cell therapy, regeneration.

Slov. chir., 2015; roč. 12(2): 51–53

Úvod

Ľudské telo tvorí približne 35 biliónov (35×10^{12}) buniek. Na to, aby taký organizmus mohol vykonávať všetky svoje funkcie, musia byť jednotlivé bunky vysokošpecializované (13). Mnohé špecializované bunky v priebehu vývoja stratili schopnosť deliť sa a dĺžka ich života sa výrazne skrátila. Táto hranica bunkového delenia je známa ako tzv. Hayflickov limit. Aby sa zachovala štruktúra a funkcie tkanív skladajúcich sa z buniek s limitujúcim bunkovým delením, je zásadné stratené bunky nahradiť. Túto úlohu plnia kmeňové bunky (10).

Kmeňové bunky

Kmeňové bunky sú definované ako primárne nediferencované bunky schopné sebaobnovy a diferencácie na iný, špecializovanejší typ buniek (12). Táto schopnosť umožňuje telu vytvoriť nové bunky, a nahradiť tak špecializované tkanivá (6). Zmena diferenciačného potenciálu kmeňovej bunky môže nastať, keď kmeňová bunka opustí svoje pôvodné „niché“ a usídli sa v novom „niché“ iného tkaniva. V ňom sa pod vplyvom nových signálnych molekúl môže zmeniť osud kmeňovej bunky natoľko, že začne produkovať odlišné potomstvo. Podľa schopnosti kmeňových buniek vytvárať rôzne druhy bunkových línii ich hierarchicky rozdelujeme na bunky totipotentné, pluripotentné, multipotentné a unipotentné bunky. Ľudské pluripotentné kmeňové bunky ako biologické zdroje majú potenciál na bunkovú terapiu, a tiež na „regeneratívnu medicínu“ (8).

Funkcie kmeňových buniek

Kmeňové bunky v mnohobunkovom organizme vykonávajú rad zásadných funkcií:

- v priebehu vývoja sú úplne prvými bunkami;
- podnecujú vznik základov jednotlivých orgánov;
- kmeňové bunky sú zodpovedné za udržanie štruktúry tkanív ako kľúčové regulátory tkanivovej homeostázy;
- v prípade poranenia tkanív sú kmeňové bunky zodpovedné za regeneráciu (hojenie) tkanív.

Zdroj kmeňových buniek

Z hľadiska odberu sa kmeňové bunky charakterizujú ako embryonálne, fetálne a dospelé kmeňové bunky. Kmeňové bunky možno získať viacerými spôsobmi. Z tkanív plodu, placenty, plodových obalov a amniovej tekutiny sa odoberajú fetálne kmeňové bunky, ktoré majú multipotentný charakter. Dospelé kmeňové bunky sa izolujú z tkanív dospelého jedinca a môžu z nich vzniknúť obmedzené línie terminálnych tkanivových buniek.

Embryonálne kmeňové bunky (ESCs) sú pluripotentné, sebaobnovujúce sa bunky derivované z vnútornej masy *in vitro* oplodnených embryí. ESCs sa dajú uložiť vo forme nediferencovaných bunkových línii a môžu byť indukované na diferenciaciu na akúkoľvek bunkovú líniu.

Ľudská placenta, pupočník a pupočníková krv sú zdrojom, z ktorého môžu byť jednoducho získané hematopoetické kmeňové bunky, ako aj

pluripotentné mezenchymálne kmeňové bunky (13, 14, 15).

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs), tiež známe ako multipotentné mezenchymálne stromálne bunky, sú podskupinou buniek, ktoré sa nachádzajú hlavne v kostnej dreni (BM – MSCs) alebo dospelých tkanivách (19). Na rozdiel od amniálnych alebo placentárnych MSCs, je získavanie kmeňových buniek z kostnej drene invazívne a technicky, ale aj finančne náročnejšie (20).

Metódy izolácie kmeňových buniek

Neexistuje štandardný protokol, podľa ktorého možno kmeňové bunky izolovať a charakterizovať z dospelých tkanív. Každé laboratórium používa svoje vlastné protokoly na izoláciu kmeňových buniek. Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu – The International Society for Cellular Therapy (ISCT) v roku 2006 predpísala štandardy na definíciu ľudských mezenchymových kmeňových buniek (MSCs). Viac ako 95 % kmeňových buniek má povrchový antigén: CD105, CD73, CD90 a $\leq 2\%$ CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 a HLADR. Ďalej sa asociujú s povrchovými antigénmi ako CD44, CD133, CD49a, LNGFR, CD10, CD13, BMPRIA, STRO-1 antigénová molekula a adhezívnymi molekulami VCAM-1, ALCAM, ICAM-1, CD29 (2).

Historicky boli prvé kmeňové bunky izolované z myši (v roku 1981); ľudské sa podarilo získať až v roku 1998. Výber metódy izolácie závisí od zdroja a typu buniek, a tiež od veku

darcu buniek. Rad metód využíva priamu izoláciu kmeňových buniek elimináciou nechcených diferencovaných buniek v bunkovej suspenzii. Eliminovať diferencované bunky je možné pomocou protilátok proti špecifickým markerom diferencovaných buniek, tie následne odseparujeme pomocou feromagnetických nanočastíc (imunomagnetická separácia). Ďalšou metódou je lýza diferencovaných buniek pomocou faktorov komplementu – zo suspenzie buniek odoberieme faktory, ktoré podporujú prežívanie diferencovaných buniek, poprípade si zvolíme také kultivačné pôdy, že ich povrch neumožní adhéziu buniek. Tieto metódy sú často kombinované s postupmi zameranými na stimuláciu proliferácie kmeňových buniek (napríklad pomocou mitogénnych rastových faktorov), čím sa kmeňové bunky udržiavajú pri kultivácii v nediferencovanom stave (16). Pretože niektoré špecifické markery kmeňových buniek sa už podarilo identifikovať, je možné využiť na izoláciu týchto buniek odpovedajúcich protilátok, napríklad pri metóde FACS (*fluorescence-activated cell sorting* – triedenie buniek pomocou fluorescencie). Na izoláciu kmeňových buniek sa tiež používajú ich špeciálne fyzikálne vlastnosti, ako napríklad veľký nukleocytoplazmatický pomer (pomer bunkového jadra voči cytoplazme). Zaujímavým prístupom, ako separovať frakciu kmeňových buniek ako vedľajšiu populáciu (*side population* – SP bunky) je využitie ich schopnosti vylučovať farbivo. Úplne novou metódou je transfekcia cieľovej bunky génom kódujúcim pluripotentný transkripčný faktor, ktorá slúži na produkciu tzv. indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (iPS) (4).

Spôsob aplikácie kmeňových buniek

Špecializované bunky sú v tkanivách uložené spolu s medzibunkovou hmotou (extracelulárna matrix), ktorá je zložená z polysacharidov a proteínov produkovaných bunkami a poskytuje im mechanickú podporu. Pomocou adhézných receptorov dochádza k interakcii medzi bunkami a medzibunkovou hmotou a prostredníctvom ďalších molekúl a rôznych procesov spolu bunky komunikujú (lokálne, ale aj na väčšie vzdialenosti). S týmito skutočnosťami treba pri väčšine zásahov tkanivového inžinierstva počítať, a správne izolované, kultivované a prípadne aj modifikované kmeňové bunky sa preto musia aplikovať do správneho prostredia. Migráciu, diferenciáciu a rast kmeňových buniek pritom ovplyvňujú rôzne faktory. Okrem typu kmeňových buniek a prípadného nosiča je to vplyv

okolitého tkaniva, ako aj lokálne a systémové rastové faktory (Blau HM, 2001).

V novo sa rozvíjajúcom odvetví regeneratívnej medicíny hrá dôležitú úlohu tkanivové inžinierstvo, ktoré na podklade znalostí biologickej štruktúry a vlastností jednotlivých tkanív študuje a vyvíja materiály rôznych vlastností, ktoré slúžia ako podporné matrice, nosiče a kostry budúcich transplantovaných tkanív a orgánov a tieto materiály spája s kmeňovými bunkami. Trojrozmerný nosič, označovaný ako „lešenie“ (scaffold) zaisťuje nasadeným kmeňovým bunkám dočasnú alebo trvalú podporu na ich migráciu, rast a sprostredkuje stimuly na následné bunkové pochody, napríklad na diferenciáciu kmeňových buniek na zrelé tkanivá. Nosiče musia mať určité vlastnosti, ako je ľahká spracovateľnosť do požadovaného tvaru, stabilita, odolnosť, a nesmú byť pre organizmus toxické. Ideálny materiál by mal byť biokompatibilný, mal by podporovať bunkovú interakciu a obnovu tkaniva a mal by vykazovať mechanické a fyzikálne vlastnosti budúceho tkaniva. Kultivácia, rozmnožovanie a prípadné vyzrievanie kmeňových buniek nasadených na nosiče prebieha buď v bioreaktore, v organizme, alebo v následnosti v oboch prostrediach. Nosiče môžu byť pripravené z rôznych materiálov biologického alebo syntetického pôvodu. Pripravujú sa buď z natívnych tkanív (kolagén, fibrín, kyselina hyalurónová, hydrogén, citosan, alginát), z acelulárnej tkanivovej matrix, ktorá obsahuje medzibunkovú hmotu pôvodného tkaniva zbavenú všetkých buniek (napríklad submukóza močového mechúra alebo tenkého čreva), alebo sa vyrábajú zo syntetických polymérov (kyselina polyglykolová, kyselina polymliečna, kyselina polykaprolaktonová), rôznych syntetických nanomateriálov, ako aj z anorganických látok (hydroxyapatit, kalciumfosfát). Možná je aj kombinácia prírodných a syntetických materiálov (Levenberg S., 2003; Placzek MR.; 2009).

Mechанизmus účinku kmeňových buniek

Kmeňové bunky alebo progenitorové bunky sú priťahované do rany signálmi vychádzajúcimi z miesta poranenia. Zistilo sa, že prostredie, v ktorom sú umiestnené kmeňové bunky (teda počet buniek, spôsob aplikácie, koncentrácia kyslíka), ovplyvňuje expresiu povrchových receptorov kmeňových buniek, ktoré odpovedajú na signály na migráciu. Čerstvo izolované kmeňové bunky majú vyššiu schopnosť uchytenia sa v cieľovom tkanive pri porovnaní s ich kópiami zmnoženými v kultúrach (23). Zistilo sa však, že pokiaľ sú kmeňové bunky umiestnené v koktail z cyto-

kínov, kmeňové bunky vykazujú expresiu CXCR4. Vystavenie kmeňových buniek hypoxickým podmienkam tak tiež zvyšuje expresiu CXCR4 a CX3 chemokínového receptora 1 (CX3CR1), čo vedie k zvýšenej migrácii. Kmeňové bunky pestované v hypoxických podmienkach aktivujú signálnu cestu, pričom sa udržiava aj ich životaschopnosť a počet bunkových cyklov (25). Expresia CXCR4 sa dá zvýšiť aj retrovírusovou expresiou, prenosom mRNA alebo pridaním cytokínu TNF-alfa (21).

Terapia kmeňovými bunkami

Bunková terapia, terapia kmeňovými bunkami, predstavuje významný pokrok pre medicínu (16). Kmeňové bunky sú vybavené unikátnymi vlastnosťami – schopnosťou sebaobnovy a diferenciácie (7), ktoré z nich robia atraktívne bunky „kandidátov“ na liečbu doposiaľ neliečiteľných ochorení, ako sú Parkinsonova choroba (15), demyelinizačné poruchy (napríklad sclerosis multiplex), Duchennova svalová dystrofia a celý rad ďalších frekventovaných a závažných chorôb, ako je infarkt myokardu, diabetes mellitus, autoimunitné ochorenia, ochorenia pečene (3).

Výhody BT:

1. nie je toxická,
2. transplantáciu stačí uskutočniť jednorázovo bez opakovania celého procesu,
3. transplantované bunky si dokážu osvojiť fenotyp odpovedajúci cieľovému tkanivu,
4. bunková terapia môže byť uskutočnená i bez detailnej znalosti všetkých mechanizmov, ktoré riadia proliferáciu i diferenciáciu transplantovaných buniek.

Vzhľadom na to, že kmeňové bunky sú biologickým východiskom všetkých somatických štruktúr, možno ich perspektívne využiť vo všetkých orgánových systémoch a vo všetkých odboroch medicíny:

- transplantácia kmeňových buniek krvotvorby je už dlhodobo významnou a neoddeliteľnou súčasťou liečby mnohých hematologických malignít (leukémia, myelodysplastický syndróm, Hodgkinova choroba, non-Hodgkinovské lymfómy, myelóm, aplastická anémia, primárna polycytémia);
- v klinických štúdiách sa aplikovali mezenchýmové kmeňové bunky u pacientov so zlyhaním pečene. Modulačné cytokíny produkované týmito bunkami dokážu inhibovať proliferáciu buniek imunitného systému a ich migráciu do pečene, čím blokujú apoptózu hepatocytov. Kmeňové bunky navyše prispievajú k regresii pečenej fibrózy a k proliferácii hepatocytov (9);

- povzbudivé výsledky sa dosiahli i v experimente pri náhradách dutých orgánov urogenitálneho systému použitím transplantátu z acelulárnej kolagénovej matrix získanej z ľudského močového mechúra, na ktorú sa nasadili kmeňové bunky (1);
- techniky prenosu kožných transplantátov a využívanie xenotransplantátov sú už desiatročia súčasťou popáleninovej chirurgie. Súčasný výskum sa zameriava na využitie kmeňových buniek, hlavne pri prenose autotransplantátov pri rozsiahlych popáleninách (11);
- v ortopédii ponúka tkanivové inžinierstvo celý rad možností. In vitro vytvorené tkanivá zahŕňajú kosti, chrupavky, mandibulárny kĺb, menisky, svaly, šlachy a väzy (14).

V blízkej budúcnosti sa plánuje ich využitie na farmakologické účely a vo farmakologickom výskume. Kmeňové bunky majú hlavné atribúty na rozvoj bunkových testov v oblasti liečiv a toxikológie (8).

Záver

Kmeňové bunky vďaka ich charakteristickým vlastnostiam majú popredné miesto v regeneračnej medicíne, ukazujú na to aj prvé klinické štúdie ich využitia na liečbu degeneratívnych ochorení. Popredné miesto majú mezenchýmové kmeňové bunky. Nachádzajú sa v organizme po celý život, postupne sa však ich počet znižuje. Ich výhodou je, že sa relatívne jednoducho dajú získať, dokážeme ich množiť v laboratórnych

podmienkach. Vyznačujú sa tiež pozoruhodnou plasticitou a schopnosťou diferencovať sa na špecializované bunky. Problematika štúdia a aplikácie kmeňových buniek je napriek mnohým úspechom však ešte stále na začiatku svojho vývoja. Tak ako pri každej inej liečbe, aj v prípade liečby kmeňovými bunkami musí byť bezpečnosť a terapeutická účinnosť ich aplikácie overená v predklinických a klinických štúdiách. No ich postavenie v rámci liečby je už teraz nezamietnuteľné a veľmi významné.

Literatúra

1. Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol*. 1999;162:1148–1151.
2. Coleman C, et al. *High Through put Characterization of the Mesenchymal Stem Cell Surface Phenotype*. Regenerative Medicine Institute. National Centre for Biomedical Engineering Science. National University of Ireland Galway. Ireland.
3. Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;17;325(3):665–669.
4. Espejel S, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte shave the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J. Clin. Invest*. 2010;120: 3120–3126.
5. Fabrizio E, et al. Therapeutic implications of colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol*. 2010;16(31):3871–3877.
6. Kittnar O, et al. *Lekárska fyziológia*. Praha: Grada; 2011.
7. Laggase E. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*. 2000;6(11):1229–1234.
8. Laustriat D, Gide J, Peschanski M. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem-SocTrans*. 2010;38(4):1051–1057.
9. Lin H, et al. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(1):19–22.

10. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88:287–298.
11. Navarro FA, et al. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J BurnCare Rehabil*. 2000;21(6):513–518.
12. Osawa M, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242–245.
13. Raven PH, et al. *Biology of Plants*. 4th ed. New York: Worth-Publishers.
14. Skuk D, Tremblay JP. Intramuscular cell transplantation as a potential treatment of myopathies: clinical and preclinical relevant data. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11(3):359–374.
15. Takagi Y, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J.Clin.Invest*. 2005;115:102–109.
16. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287:1442–1446.
17. Zalzman M, et al. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype. *Diabetes*. 2005;54:2568–2575.
18. Blau HM. Clinical implications for basic research: Cell therapies for Muscular Dystrophy (invited review). *N. Engl. J. Med*. 2008;359(13):1410–1412.
19. Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:12741–12746.
20. Hudák A, Lakyová L, Radoňák J. Typy kmeňových buniek potenciálne využiteľných pri hojení chronických diabetických rán. *Slovenská chirurgia*. 2014;11(4):132–135.
21. Lakyová L, Radoňák J. Využitie kmeňových buniek kostnej drene pri hojení chronických kožných rán – review. *Slovenská chirurgia*. 2013;10(2):48–51.

MUDr. Martina Vidová
I. chirurgická klinika LF UPJŠ
a UN L. Pasteura
Trieda SNP 1, 040 11 Košice
vidova.martina@gmail.com
