

TERAPEVTSKA **BIOTEHNOLOGIJA**

– MATIČNE CELICE

UČBENIK ZA ŠTUDENTE



Elvira Maličev
Ljubljana, 2024

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 210782211](https://nuk.ub.uni-lj.si/COBISS.SI-ID/210782211)

ISBN 978-961-6596-24-4 (PDF)

Terapevtska biotehnologija – matične celice

Učbenik za študente

Avtorica

izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Priprava slik in ureditev besedila

Ana Kolenc, mag. bioteh.

Pregled besedila

Primož Poženel, dr. med.

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Recenzenzija

prof. dr. Kristina Sepčič, univ. dipl. biol.

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

prof. dr. Primož Rožman, dr. med.

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Založba

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Ljubljana, 2024

Dostopnost:

<http://www.ztm.si/raziskave-razvoj-izobrazevanje/izobrazevanje/izobrazevalni-programi-v-okviru-univerze-in-sol/>



KAZALO

1. UVOD	7
2. MATIČNE CELICE	7
2.1 KRVOTVORNE MATIČNE CELICE	9
2.1.1. Splošne lastnosti krvotvornih matičnih celic	9
2.1.2 Zgodovina raziskovanja krvotvornih matičnih celic	11
2.1.3 Vpliv mikrookolja na krvotvorne matične celice	11
2.1.4 Nastajanje krvnih celic	16
2.1.5 Uporaba krvotvornih matičnih celic za zdravljenje	17
2.1.6 Viri krvotvornih matičnih celic za presaditve	18
2.1.7 Celične kulture krvotvornih matičnih celic	20
2.1.8 Diferenciacija v zrele krvne celice	21
2.1.9 Analize krvotvornih matičnih celic	26
2.2 ENDOTELIJSKE PREDNIŠKE CELICE	29
2.2.1 Celične kulture endotelijskih celic	30
2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE	31
2.3.1 Splošne lastnosti mezenhimskih matičnih celic	31
2.3.2 Zgodovina raziskovanja mezenhimskih matičnih celic	34
2.3.3 Viri mezenhimskih matičnih celic	37
2.3.4 Zdravila za napredno zdravljenje	38
2.3.5 Heterogenost mezenhimskih matičnih celic	39
2.3.6 Celične kulture mezenhimskih matičnih celic	40
2.3.7 Analize mezenhimskih matičnih celic	44
2.3.8 Uporaba mezenhimskih matičnih celic za zdravljenje	47
2.3.8 Bioaktivne molekule mezenhimskih matičnih celic	50
2.4 ZUNAJCELIČNI VEZIKLI	53
2.4.1 Vrste zunajceličnih veziklov in njihov nastanek	53
2.4.2 Pridobivanje in shranjevanje zunajceličnih veziklov	58
2.4.3 Analize zunajceličnih veziklov	58
2.4.4 Uporaba zunajceličnih veziklov za zdravljenje	60
2.5 PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE	62
2.5.1 Splošne lastnosti pluripotentnih matičnih celic	62
2.5.2 Zgodovina raziskovanja pluripotentnih matičnih celic	63
2.5.3 Embrionalne matične celice	63
2.5.4 Inducirane pluripotentne matične celice (iPSC)	65
2.5.5 Identifikacija pluripotentnih matičnih celic	66
2.5.6 Uporaba pluripotentnih matičnih celic za zdravljenje	67
2.5.7 Kontrola kakovosti celičnega pripravka	67
2.6 ORGANOIDI	68

2.7 NEVRONSKE MATIČNE CELICE	69
2.7.1 Raziskave uporabe nevrnskih matičnih celic za zdravljenje	70
2.8 NOSILNI MATERIALI ZA CELICE	71
2.8.1 Naravni materiali	71
2.8.2 Postopki decelularizacije tkiva	72
2.8.3 Sintetični nosilni materiali	73
3. LITERATURA	75

KAZALO SLIK

Slika 1: Simetrična in asimetrična delitev matične celice in diferenciacija v specializirane celice.....	8
Slika 2: Pregled razvrstitve matičnih celic glede na diferencijski potencial, ki odraža sposobnost tvorbe različnih tipov celic.....	9
Slika 3: Razvoj krvnih celic iz krvotvornih matičnih celic.....	10
Slika 4: Signali, ki jih matična celica dobi znotraj okoljske niše, vplivajo na njeno usodo.....	12
Slika 5: Zgradba kostnega mozga. Kostni mozeg sestavljajo krvotvorne in nekrvotvorne celice, ki neposredno ali posredno vplivajo na matične celice.	12
Slika 6: Regulacija celičnega cikla in aktivacija krvotvornih matičnih celic.	13
Slika 7: Prikaz strukture in organizacije okoljske niše krvotvornih matičnih celic.	14
Slika 8: Migracija krvotvornih celic med razvojem krvotvornega sistema.	17
Slika 9: Zbiranje krvotvornih matičnih celic s celičnim ločevalcem.....	19
Slika 10: Odvzem matičnih celic iz kostnega mozga (levo) in zbiranje popkovnične krvi ob	19
Slika 11: Različni dejavniki, ki vplivajo na pomnoževanje krvotvornih matičnih celic ex vivo.	21
Slika 12: Nastajanje krvnih celic poteka postopoma preko linijsko usmerjenih predniških celic. Procese regulirajo hormoni, rastni dejavniki, citokini in drugi dejavniki v okolici celic.....	23
Slika 13: Shematični prikaz nastanka eritrocita iz krvotvorne matične celice.	25
Slika 14: Shematični prikaz nastanka trombocitov.....	26
Slika 15: Nekateri membranski označevalci celične pripadnosti in molekule, ki vplivajo na stanje krvotvorne matične celice.	27
Slika 16: S CFU-GM testom opazujemo kolonije granulocitov (levo), s CFU-E testom pa kolonije eritrocitov (desno).....	29
Slika 17: Pripravki krvotvornih matičnih celic.	29
Slika 18: Lastnosti mezenhimske matoične celice.....	31
Slika 19: Prikaz vpliva mezenhimske matične celice na procese v telesu.	33
Slika 20: Pregled registriranih kliničnih študij z mezenhimijskimi matičnimi celicami.....	34
Slika 21: Izolacija mezenhimske matične celice iz kostnega mozga.....	34
Slika 22: Glavni mejniki raziskovanja, poimenovanja in terapevtske uporabe MSC.	36
Slika 23: Z liposukcijo pridobimo večje število matičnih celic kot pri izrezani maščobi	38
Slika 24: Pridobivanje mezenhimske matične celice iz maščobnega tkiva.	39
Slika 25: Heterogenost mezenhimske matične celice.	40
Slika 26: Bioreaktor z mešalom za pomnoževanje mezenhimske matične celice.....	42
Slika 27: Gojenje mezenhimske matične celice v 2D in 3D celičnih kulturah.	43
Slika 28: Gojenje mezenhimske matične celice v gojilnih vrečkah za enkratno uporabo, v statičnih pogojih na mikronosilcih (Thermo Scientific).....	44
Slika 29: Primer fenotipske analize mezenhimske matične celice s pretočnim citometrom.....	46

Slika 30: Funkcijski test za potrditev sposobnosti diferenciacije celic.	47
Slika 31: Mehanske ovire med potovanjem mezenhimskih matičnih celic (MSC) po telesu.	50
Slika 32: Multifunkcionalnost mezenhimskih matičnih celic.....	52
Slika 33: Nastanek eksosomov in mikroveziklov.	54
Slika 34: Vrste zunajceličnih veziklov: eksosomi, mikrovezikli in apoptotska telesca.....	55
Slika 35: Prikaz eksosoma, ki lahko nastane iz katerekoli celice in postopki izolacije/čiščenja eksosomov.....	57
Slika 36: Postopki za identifikacijo zunajceličnih veziklov iz mezenhimskih matičnih celic.	58
Slika 37: Karakterizacija zunajceličnih veziklov po ultracentrifugiranju.....	59
Slika 38: Raziskave uporabnosti eksosomov za zdravljenje.	61
Slika 39: Kolonija pluripotentnih matičnih celic, ki za rast v celični kulturi potrebujejo hranilni sloj (inaktivirani fibroblasti, gel).	62
Slika 40: Pridobivanje embrionalnih matičnih celic in priprava celične culture.....	64
Slika 41: Avtologne inducirane pluripotentne matične celice (iPSC).	64
Slika 42: Različni načini priprave iPSC in njihova uporaba v medicini.	65
Slika 43: Epigenetske spremembe med reprogramiranjem in diferenciacijo celic.	67
Slika 44: Pomankljivosti celičnih kultur organoidov in sodobni pristopi za njihovo odpravo (mikrofluidne naprave organ-na-čipu ali organski čip).	69
Slika 45: Nosilni materiali za celice.....	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Citokini, kemokini in rastni dejavniki, ki jih izločajo krvotvorne matične celice.	16
Preglednica 2: Časovnica za mejniki uporabe krvotvornih matičnih celic za zdravljenje	18
Preglednica 3: Najpogostejši označevalci celične pripadnosti mezenhimskih matičnih celic in njihova funkcija.	37
Preglednica 4: Laboratorijski postopki za določanje števila in lastnosti mezenhimskih matičnih celic	45
Preglednica 5: Bioaktivne molekule mezenhimskih matičnih celic in njihovi imunomodulatorni učinki	50
Preglednica 6: Glavne značilnosti eksosomov, mikroveziklov in apoptotičnih telesc.....	55

TERAPEVTSKA BIOTEHNOLOGIJA – matične celice

1. UVOD

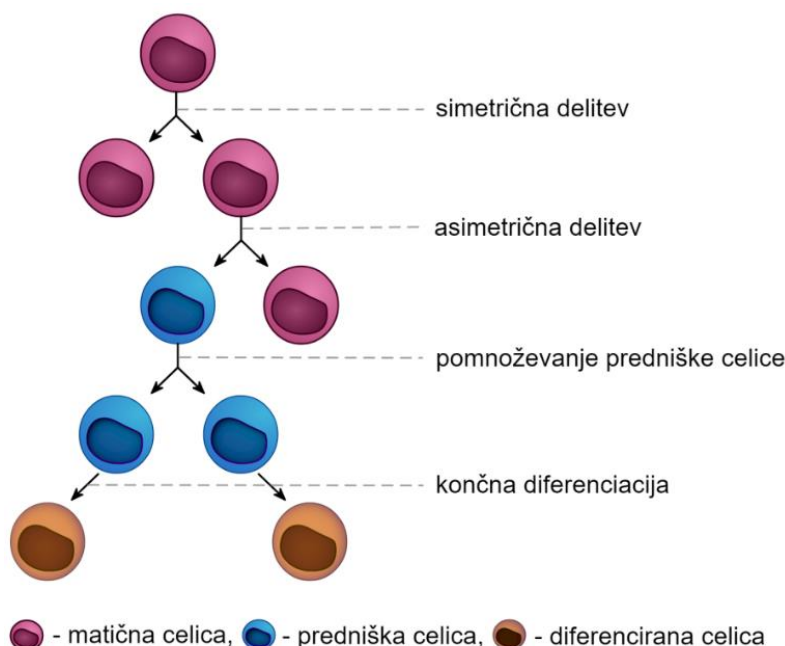
Terapevtska **biotehnologija je področje, ki se ukvarja z zbiranjem, gojenjem, spreminjanjem in analizo celic ali njihovih produktov, z namenom raziskovanja ali klinične uporabe.** Zaradi potenciala matičnih celic, da se diferencirajo v različne tipe celic in njihovega vpliva na številne procese v telesu, so matične celice ključne celice, s katerimi se ukvarja področje terapevtske biotehnologije. Matične celice so začele svojo vlogo v sodobni regenerativni medicini v petdesetih letih 20. stoletja s prvo presaditvijo kostnega mozga leta 1956. Ta preboj je utrl pot terapijam z različnimi matičnimi celicami, ki so že na voljo ali pa še bodo v prihodnosti z nadaljnjim razvojem in izpopolnjevanjem laboratorijskih in kliničnih tehnik.

V telesu prisotne matične celice, kot so krvotvorne in mezenhimske matične celice, se že desetletja uporabljajo v terapevtske namene. V zadnjem času so se jim pridružile še pluripotentne matične celice ter brezcelični pripravki s produkti matičnih celic. Razvoj novih tehnologij vodi v uporabo naslednje generacije matičnih celic in njihovih produktov, ki se bodo kot "trojanski konji" uporabljali za dostavo zdravil in onkolitičnih virusov v tumorje, za dostavo angiogenih, nevrotrofičnih in protivnetnih molekul za

pospešitev obnove poškodovanih ali obolelih tkiv itd.. Tehnologije genske terapije bodo omogočale ustvarjanje matičnih celic z izboljšano funkcionalnostjo in specifičnostjo v primerjavi z njihovimi naravnimi primerki, razvoj tehnologij pridobivanja celic iz tkiv, gojenja celic in analize pa bodo zagotovili njihovo varno in učinkovito uporabo za zdravljenje.

2. MATIČNE CELICE

Matične celice so **nediferencirane celice, sposobne tako simetrične kot asimetrične celične delitve.** Pri asimetrični delitvi nastaneta hčerinski celici, pri čemer je prva celica identična kopija matične celice, druga pa predniška celica specializirane tkivne celice. **Z nadaljnjo delitvijo predniških celic nastajajo vse bolj diferencirane celice, ki tvorijo različna tkiva** (Slika 1). Proces spodbudijo različni okoljski dejavniki, dozorevanje celic pa je natančno kontrolirano z izražanjem specifičnih genov in njihovih produktov, kar se odraža na morfoloških in funkcionalnih spremembah celic. Čeprav se predniške celice delijo zelo hitro, je število njihovih delitev omejeno. Po določenem času se razvijejo v dokončno diferencirane celice, ki se običajno ne delijo več in kmalu odmrejo.



Slika 1: Simetrična in asimetrična delitev matične celice in diferenciacija v specializirane celice.

Sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije matičnih celic v različne vrste celic jim omogoča edinstven način delitve: z simetrično delitvijo proizvajajo dve identični hčerinski celici, z asimetrično delitvijo pa celici z različnima celičnima usodama. Ravnovesje med obema oblikama delitve je bistveno za vzdrževanje tkiva.

Glede na sposobnost diferenciacije v različne vrste celic (potentnost) delimo matične celice v različne skupine (Slika 2):

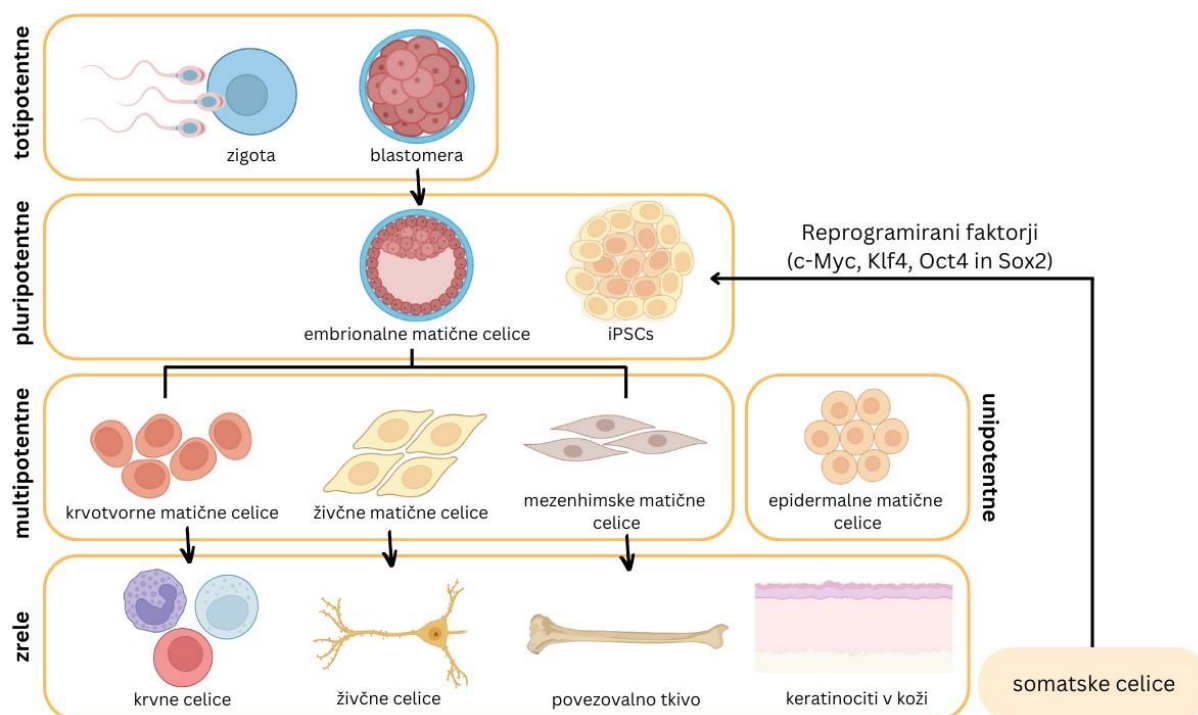
Totipotentne matične celice nastanejo z zigoto in se ohranjajo v zgodnjih celičnih delitvah zarodka do stadija morule. Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti. **Totipotentne celice lahko tvorijo celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom.**

Pluripotentne matične celice so sposobne tvoriti vse telesne celice, vključno s spolnimi celicami, ne morejo pa več tvoriti ekstraembrionalnih tkiv. Primer pluripotentnih matičnih celic so **embrionalne matične celice**. *In vivo* je pluripotentno stanje embrionalnih celic

kratko prehodno stanje v razvoju zarodka, ki nato vodi v nadaljno diferenciacijo celic in v pojav embrionalnih tkiv.

Multipotentne matične celice lahko tvorijo različne vrste celic, ki pripadajo isti zarodni plasti. Večina matičnih celic, ki se nahaja v tkivih odraslih je multipotentnih. **Primer multipotentnih matičnih celic sta krvotvorna in mezenhimska matična celica.**

Unipotentne matične celice so značilne za posamezno tkivo in se lahko razvijejo v samo eno vrsto specializirane celice. Primer unipotentne matične celice je **mišična matična celica**.



Slika 2: Pregled razvrstitve matičnih celic glede na diferenciacijski potencial, ki odraža sposobnost tvorbe različnih tipov celic.

Matične celice lahko razvrstimo tudi glede na vir njihovega pridobivanja:

Embrionalne matične celice, ki jih običajno pridobimo iz 7-10 dni stare blastociste. Te celice so pluripotentne, zato so uporabne za širok spekter aplikacij, vendar lahko njihovo pridobivanje sproži etična vprašanja, zato njihova uporaba ni priporočljiva.

Inducirane pluripotentne matične celice so somatske celice, ki jih v laboratoriju reprogramiramo tako, da pridobijo lastnosti embrionalnih matičnih celic - pluripotentnost.

Matične celice odraslega osebka so odkrili v skoraj vseh tkivih. So maloštevilne in se nahajajo v posebnem mikrookolju, ki mu pravimo niša matičnih celic. Najpogosteje se za zdravljenje uporabljajo krvotvorne in mezenhimske matične celice.

2.1 KRVOTVORNE MATIČNE CELICE

2.1.1. Splošne lastnosti krvotvornih matičnih celic

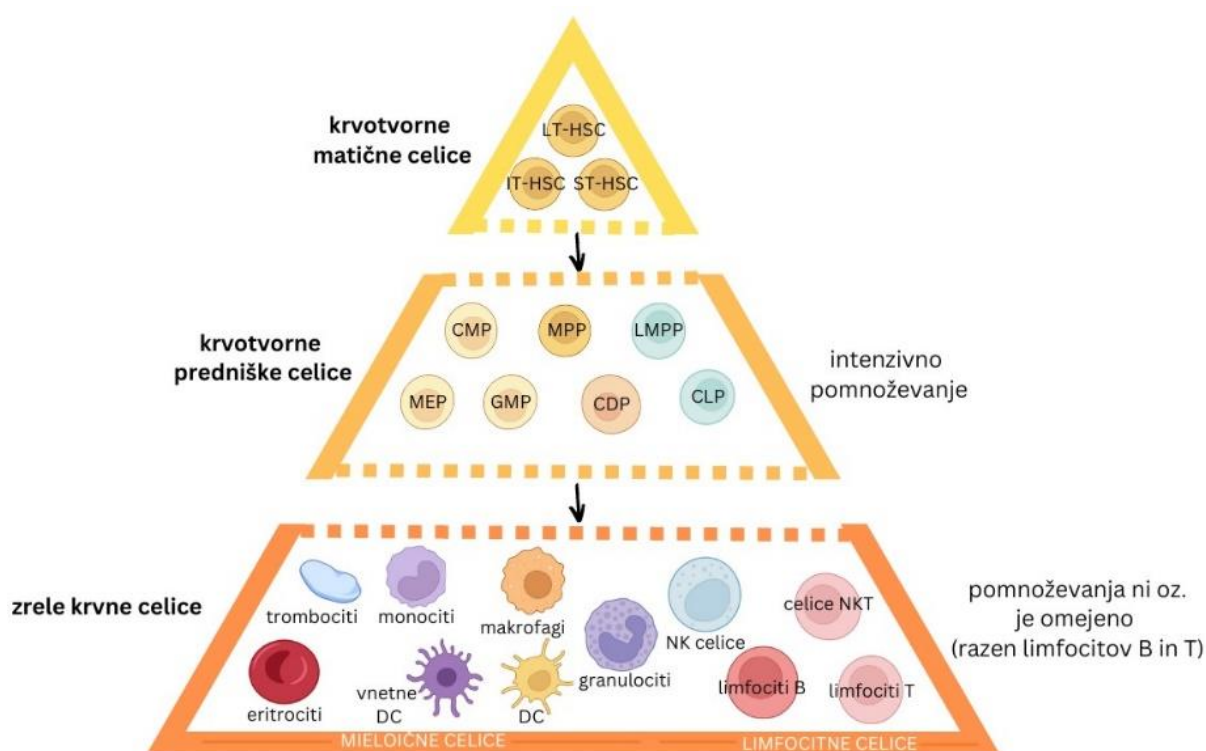
Krvotvorne matične celice (KMC) skrbijo za nadomeščanje propadlih krvnih celic. Iz KMC nastanejo vse celične komponente krvi: od eritrocitov, ki omogočajo učinkovito prenašanje kisika, megakariocitov in njihovih potomcev trombocitov, ki sodelujejo pri zaustavljanju krvavitve, do celic prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, ki delujejo ob napadu mikrobov.

Večina KMC se nahaja v spečem stanju v kostnem mozgu, precej manj jih kroži v krvi in drugih organih. Z delitvijo in dozorevanjem predniških celic nastajajo zrele krvne celice, ki zapustijo kostni mozeg in preidejo v kri. **Proizvodnja krvnih celic ali hematopoeza poteka v**

organizmu neprekinjeno tekom celega življenja. Proces nastajanja krvnih celic je natančno uravnavan s hormoni, citokini, kemokini, pri čemer sodelujejo različne vrste celic.

Za KMC je značilna multipotentnost oziroma sposobnost celice, da ustvari različne vrste zrelih funkcionalnih krvnih celic. Med tem procesom gredo celice skozi številne spremembe in postajajo z

vsakim korakom vedno bolj specializirane. Tako z dozorevanjem multipotentnih matičnih celic najprej nastajajo v limfatično ali v mieloično vrsto usmerjene predniške celice krvnih celic. **Matična celica mieloične vrste dozoreva v predniške celice rdeče vrste, nevtrofilno-monocitne, eozinofilne in bazofilne vrste ter megakariocitno-trombocitne vrste. Iz celic limfatične vrste nastajajo limfociti B in limfociti T ter plazmatke** (Slika 3, 12).



Slika 3: Razvoj krvnih celic iz krvotvornih matičnih celic.

V primerjavi s specializiranimi celicami je matičnih celic zelo malo, največ se jih nahaja v kostnem mozgu.

Krvne celice so potomke okrog 20.000 različnih klonov KMC. Posamezni kloni KMC se med seboj že v osnovi razlikujejo po tem, katero celično linijo ustvarjajo, po zmožnosti samoobnavljanja, proliferacije, hitrosti cikla celičnih delitev ter sposobnosti migracije in vgneždenja KMC v nišo matičnih celic. Vsaka podskupina

KMC ima svoj lastni epigenetsko določen program za diferenciacijo in samoobnavljanje. Krvotvornega sistema tako ne vzdržuje samo ena vrsta KMC, temveč nabor številnih vrst različnih KMC.

2.1.2 Zgodovina raziskovanja krvotvornih matičnih celic

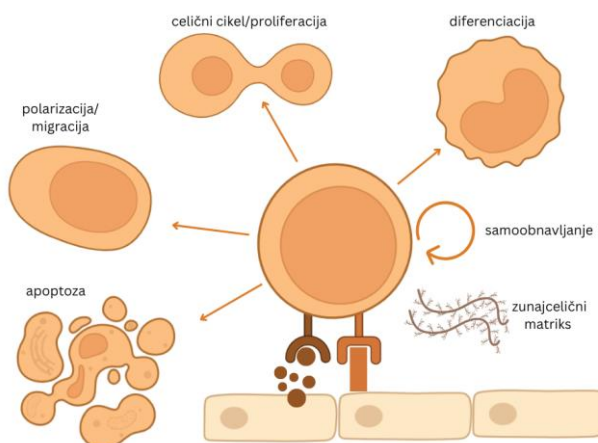
Raziskovanje takrat še ne poimenovanih KMC se je začelo v začetku petdesetih let prejšnjega stoletja. Znanstvenika James Till in Ernest McCulloch sta v poskusih miši predhodno obsevala, nato pa jim presadila kostni mozeg neobsevanih miši. Pri obsevanih miših sta po presaditvi kostnega mozga v vranicah dokazala nastanek novih kolonij krvnih celic, ki so lahko nastale le iz presajenih KMC. Te raziskave so bile ključne za razvoj koncepta matičnih celic kot celic v kostnem mozgu, ki so sposobne ustvariti celoten sistem krvnih celic, čeprav same KMC takrat še niso bile izolirane in okarakterizirane. Ugotovili so, da so bile določene predniške celice sposobne oblikovati več krvotvornih linij znotraj ene kolonije (**multipotentnost**), medtem ko so bile druge sposobne tvoriti hčerinske celice, ki so ohranile značilnosti starševske celice (**samoobnavljanje**). Ti dve lastnosti sta bili kasneje določeni kot **temeljni lastnosti KMC**. Rezultati raziskav na živalih so vodili v poskuse presaditev KMC pri ljudeh. Po nekaj neuspešnih poskusih je bila **leta 1957** v New Yorku opravljena prva uspešna presaditev kostnega mozga za zdravljenje akutne levkemije. Presaditev so opravili med enojajčnimi dvojčki (**singenska presaditev**). Zdravnik E. Donnell Thomas, ki je opravil prve presaditve, je z raziskavami kostnega mozga nadaljeval in kasneje za svoje delo prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino. **O prvi uspešni alogenski presaditvi kostnega mozga so poročali leta 1968.** Opravili so jo v Minnesoti pri

pediatričnem bolniku s hudim sindromom kombinirane imunske pomanjkljivosti. Od takrat je število **alogenskih** (darovalčeve celice) in **avtolognih** (darovalec celic in prejemnik sta ista oseba) presaditev matičnih celic naraščalo tako v ZDA kot po svetu. Center za mednarodne raziskave presaditev krvi in kostnega mozga (CIBMTR) je poročal o več kot 8 000 alogenskih presaditvah, izvedenih v ZDA leta 2022. Še večje je bilo število avtolognih presaditev, ki je doseglo število 12 000.

2.1.3 Vpliv mikrookolja na krvotvorne matične celice

Največ KMC se nahaja v kostnem mozgu, kjer niso naključno razporejene po tkivu, ampak se nahajajo v posebnih mikrookoljih ali okoljskih nišah (Slika 5).

Niša kostnega mozga s svojo specializirano zgradbo zagotavlja KMC zatočišče za preživetje ter jim po potrebi omogoča podvojevanje in diferenciacijo (Slika 4). Ključna naloga niše je namreč ohranjanje stalne zaloge matičnih celic in dinamično uravnavanje njihove samoobnove in diferenciacije z namenom zagotavljanja homeostaze in regeneracije tkiva.

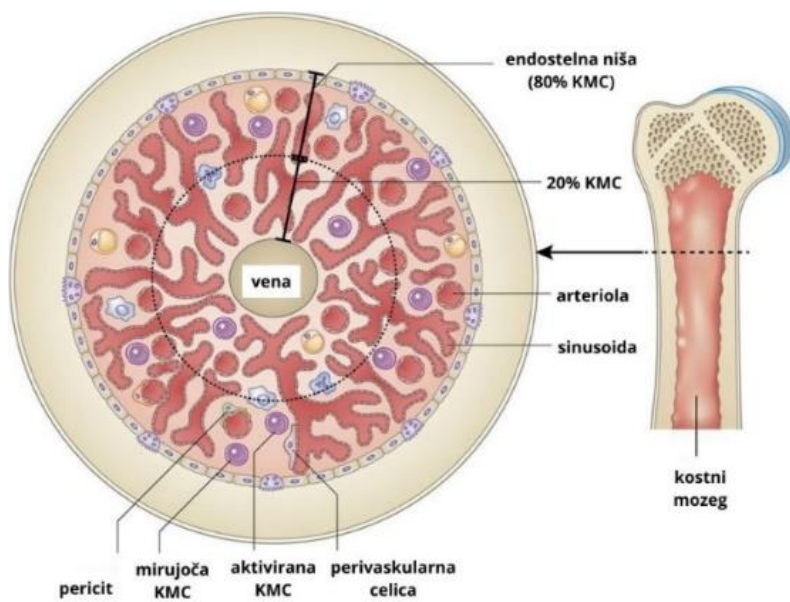


Slika 4: Signali, ki jih matična celica dobi znotraj okoljske niše, vplivajo na njeno usodo.

2.1.3.1 Mirujoče stanje matičnih celic in njihova aktivacija

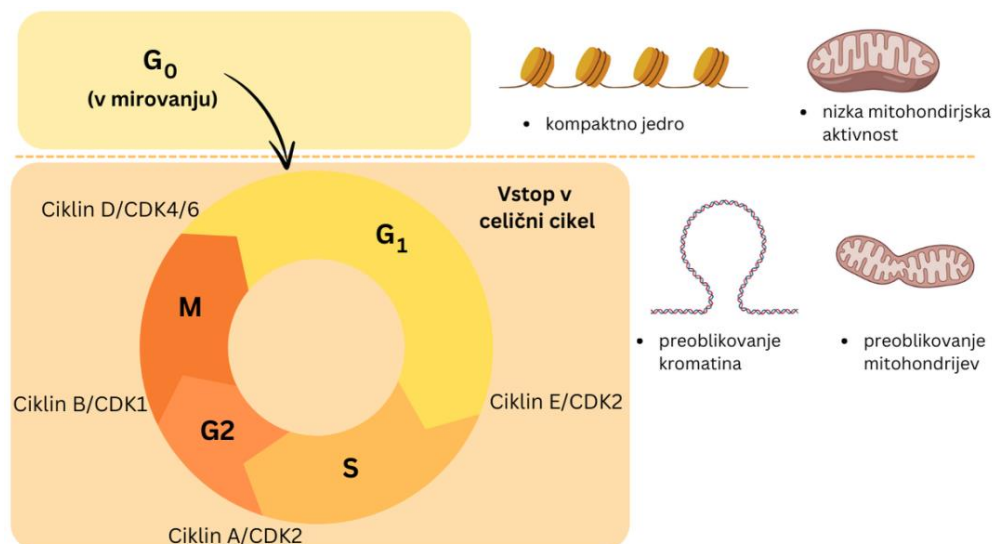
KMC so večino svojega življenja v neaktivnem stanju ali mirovanju. Mirovanje je reverzibilno stanje in igra pomembno vlogo pri vzdrževanju števila

matičnih celic v različnih tkivih. Mirujoče stanje celice ščiti pred poškodbami in preprečuje kopičenje mutacij DNK. Na mirovanje vplivajo epigenetske spremembe. Regulacija mirovanja je zapleten proces, ki vključuje veliko signalnih poti, v katerih sodelujejo različne celice. Študije mirujočih KMC so pokazale, da celice izražajo visoke ravni genov, ki sodelujejo pri zastoju celičnega cikla in popravljanju DNK, medtem ko so bili geni, povezani s proliferacijo in diferenciacijo celic, utišani. Ob povečani potrebi po krvnih celicah in po poškodbi se KMC aktivirajo in delijo (Slika 6). Hčerinske celice KMC se nato bodisi nadalje delijo in diferencirajo ter tako obnovijo zalogo krvnih celic ali pa vrnejo v mirovanje in presnovno neaktivnost.



Slika 5: Zgradba kostnega mozga. Kostni mozeg sestavljajo krvotvorne in nekrvotvorne celice, ki neposredno ali posredno vplivajo na matične celice.

Privzeto po Mendelson A, Frenette PS. Nat Med. 2014



Slika 6: Regulacija celičnega cikla in aktivacija krvotvornih matičnih celic.

Mirujoče KMC imajo kompaktno jedro, značilne epigenetske spremembe in nizko mitohondrijsko aktivnost. Ob vstopu v celični cikel so KMC podvržene preoblikovanju kromatina in mitohondrijev. Cyclin-Cdk - kompleksi na vsaki kontrolni točki.

Proces zorenja, ki ga spodbudijo različni okoljski dejavniki, se prične z asimetrično delitvijo KMC. Postopoma in preko različnih predniških celic nastaja zrela krvna celica. Dozorevanje krvne celice se natančno kontrolira z izražanjem specifičnih genov in njihovih produktov. Novo nastali proteini lahko služijo kot receptorji za rastne dejavnike, so adhezijske molekule, encimi ali signalne molekule, pri številnih molekulah pa njihove vloge še ne poznamo. Z detekcijo teh molekul, ki jim pravimo tudi **označevalci celične pripadnosti**, lahko celice identificiramo in določimo njihovo stopnjo diferenciranosti in jih tudi fizično ločimo od drugih celic.

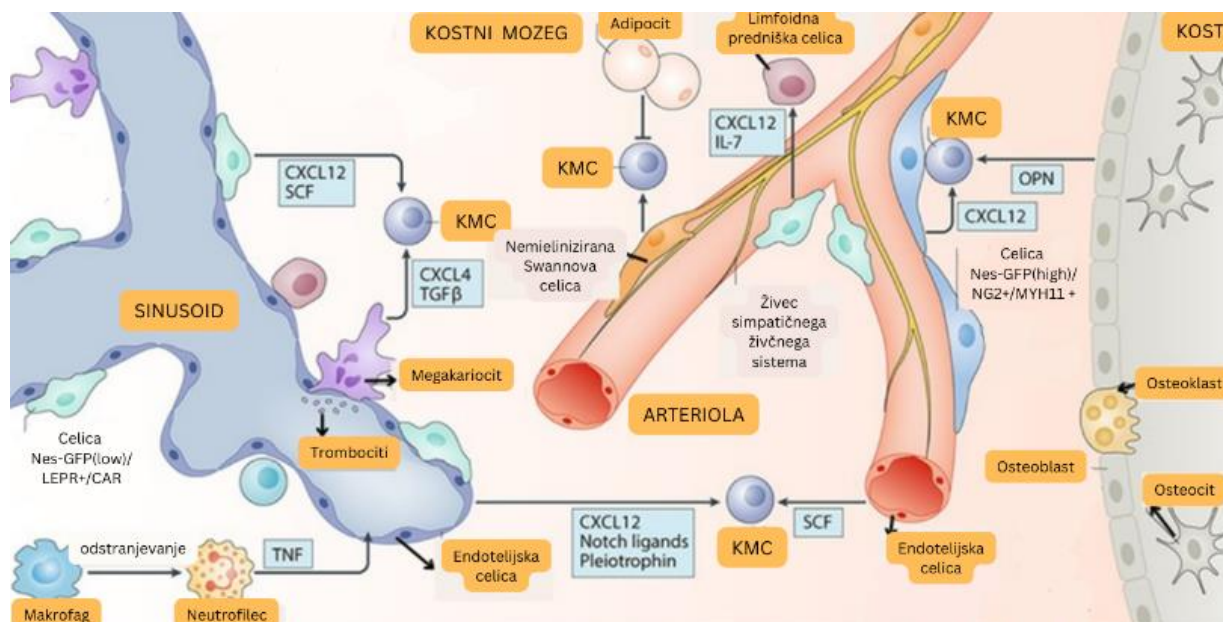
2.1.3.2 Zgradba niše krvotvornih matičnih celic

Nišo KMC sestavljajo **celice strome ali podporne celice ter komponente medceličnine**, kar omogoča KMC

prejemanje in oddajanje signalov. **KMC prejemajo signale v obliki molekul, ki jih izločajo druge celice, preko fizičnih kontaktov s sosednjimi celicami ter preko določenih sestavin medceličnine.**

Stromo sestavljajo **mezenhimske matične celice, adipociti, fibroblasti, osteoklasti, osteoblasti, endotelijske celice in nevronske celice** (Slika 7). Struktura ter organizacija mikrookolja KMC ohranja matične celice znotraj niše in omogoča migracijo predniških celic iz niše ter njihovo diferenciacijo v specializirane celice tkiva. Več tipov celic deluje v niši na KMC prek neposrednih ali posrednih mehanizmov. **Mezenhimske stromalne matične celice proizvajajo kemokin SDF-1 α** (Stromal cell-Derived Factor 1 α ali stromalni dejavnik 1 α), znan tudi kot **CXCL12** (C-X-C motif chemokine 12 ali CXC kemokinski ligand 12), ki je najpomembnejša signalna molekula za KMC v niši, in **SCF** (Stem Cell Factor ali

dejavnik matičnih celic). **KMC izražajo kemokinski receptor CXCR-4, na katerega se veže SDF-1 α kar ohranja KMC v mirovanju.**



Slika 7: Prikaz strukture in organizacije okoljske niše krvotvornih matičnih celic.

Specifično mikrookolje omogoča matičnim celicam zadrževanje znotraj niše ter migracijo predniških celic iz niše in njihovo nadaljno diferenciacijo v specializirane celice krvi. Legenda: NG2, nevronske-glijalni antigen 2, znan tudi kot hondroitin sulfat proteoglikan 4 (CSPG4); Myh11, težka veriga miozina 11; CXCL12, CXC kemokinski ligand 12, znan tudi kot faktor, pridobljen iz stromalnih celic (SDF1); SCF, dejavnik matičnih celic, znan tudi kot Kit ligand (KITL); CXCL4, CXC kemokinski ligand 4, znan tudi kot trombocitni faktor 4 (PF4); TPO, trombopoetin; PGE2, prostaglandin E2.

Nes-GFP+/CXCL12-velike retikularne (CAR)/LEPR+ mezenhimske matične celice so glavni proizvajalec nišnih dejavnikov, kot sta CXCL12 in SCF. **Osteoblasti, osteociti in adipociti** so tudi vpleteni v regulacijo KMC, vendar tu specifični molekularni signali niso natančno raziskani. **Endotelijske celice** uravnavajo vzdrževanje KMC in aktivnost perivaskularnih celic. Adrenergični živčni končiči iz simpatičnega živčnega sistema uravnavajo mobilizacijo KMC. Schwannove celice lahko prispevajo k mirovanju KMC prek signalizacije **TGFβ** (Transforming Growth Factor ali transformirajoči rastni

dejavnik). Nišo KMC poleg stromalnih sestavljajo tudi različne krvne celice. Potomci KMC (npr. **makrofagi**) lahko posredno uravnavajo zadrževanje KMC v niši prek nišnih celic. Drugi potomci KMC (**megakariociti**) lahko izvajajo povratno zanko za spodbujanje mirovanja KMC prek neposrednih mehanizmov (CXCL4 in TGFβ), neodvisnih od celic stromalne niše. **Limfociti T** lahko tudi vplivajo na KMC, neposredno ali posredno preko stromalnih celic. **Neutrofilci** večinoma prispevajo k regulaciji KMC neposredno ali preko vpliva na makrofage in stromalne celice. Poleg mezenhimske stromalne celice izražajo

CXCL12 tudi endotelijske celice in osteoblasti, vendar od 100-1000-krat manj. **SCF je lahko membransko vezan ali v topni obliki.** Njegova regulacija poteka z ecimom MMP9 (matriksna metalopeptidaza 9), ki cepi SCF in spodbuja aktivacijo KMC. SCF je zgodnje delujoči citokin, ki se veže na receptor c-Kit, receptorsko tirozin kinazo tipa III. Vezava SCF povzroči aktivacijo poti fosfatidilinozitol 3-kinaze, JAK/STAT in MAPK.

Trombopoetin (TPO) je še en pomemben citokin, ki spodbuja samoobnavljanje in pomnoževanje KMC. TPO se veže na receptor cMpl in lahko aktivira več različnih signalnih poti. Ligand tirozin kinaze 3 (Flt3L), ki se veže na Flt3, podoben Fms, podpira preživetje KMC. **SCF, TPO in Flt3L se uporabljajo kot dodatki gojišču v številnih protokolih za pomnoževanje KMC.** Poleg teh dodatkov se uporabljajo tudi IL 3 in IL 6, granulocitno-makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF), granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF), CXCL12, TGF β , osteopontin, angiopoetin-1 in insulinu podoben rastni dejavnik 1.

Niša KMC je tudi okolje, ki ščiti KMC pred imunskim napadom. Pri tem sodelujejo **regulatorni limfociti T**, ki so v neposredni bližini KMC. Strukturni proteini, kot so **kolagen, fibronektin in laminin**, celicam omogočajo adhezijo in mehanotransdukcijo. Tako matične celice preko medceličnih interakcij in interakcij z medceličnino zaznavajo tudi fizikalne dražljaje (npr. temperatura, delni tlak kisika). Nizek delež kisika v niši ohranja

KMC v nizko metaboličnem stanju in s tem preprečuje njihovo izčrpanje ter kopičenje mutacij, ki bi lahko vodile v maligno stanje. V prostor niše vstopata tudi terminalno živčevje ter žilje. Vse komponente niše s svojimi signali posredno in neposredno uravnavajo delovanje KMC, zaradi zapletenosti teh odnosov pa mehanizmi delovanja še niso dokončno razjasnjeni.

Kompleksnost mikrookolja KMC se kaže tudi v raznolikosti niš, saj so ugotovili, da kostni mozeg sestavljajo različne niše z različnimi komponentami in funkcionalnimi vlogami v hematopoezi. Znano je tudi, da lahko spremembe v stromalnih celicah, ki sestavljajo mikrookolje KMC, prispevajo k hematološki patologiji in razvoju bolezni.

Tudi KMC izločajo številne bioaktivne molekule in tako vplivajo na druge matične, predniške ali zrele celice (Preglednica 1).

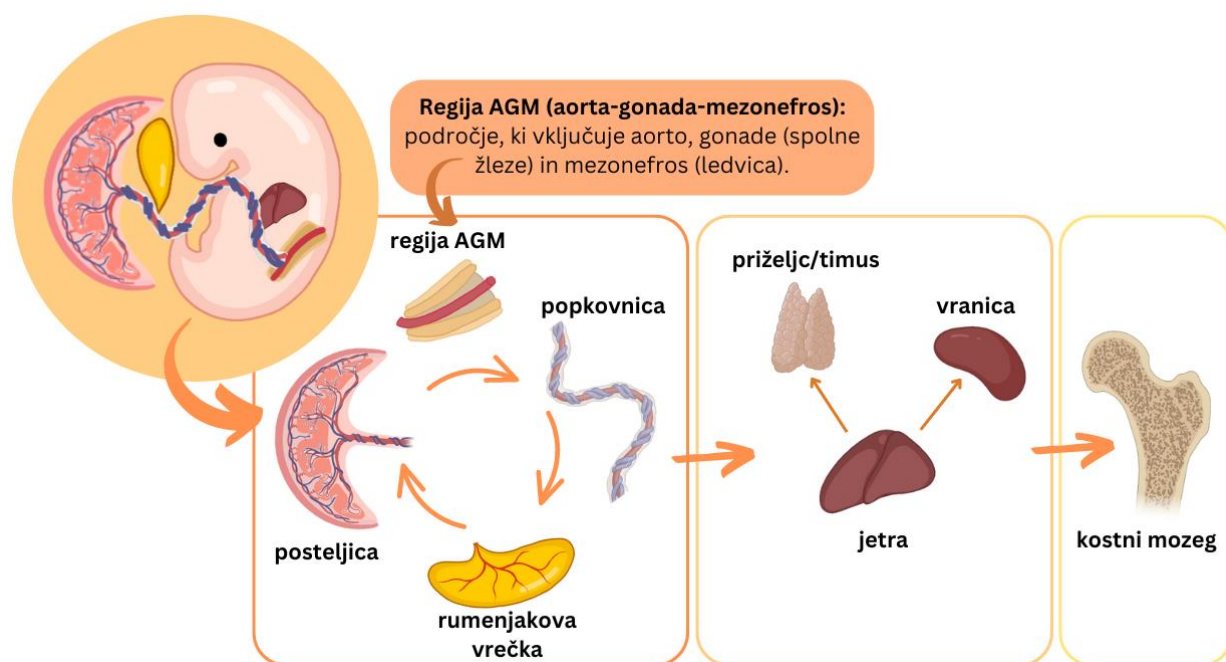
Preglednica 1: Citokini, kemokini in rastni dejavniki, ki jih izločajo krvotvorne matične celice.

Oznaka	Molekula
KL	citokin KIT-ligand
FLT-3	receptor tirozin kinaze 3
FGF-2	fibroblastni rastni dejavnik 2
FGF-6	fibroblastni rastni dejavnik 6
VEGF	rastni dejavnik žilnega endotelija
HGF	hepatocitni rastni dejavnik
IGF-1	inzulinu podoben rastni dejavnik 1
IL-1	interlevkin 1
IL-5	interlevkin 5
IL-8	interlevkin 8
IL-10	interlevkin 10
IL-13	interlevkin 13
IL-16	interlevkin 16
TPO	trombopoetin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α
IFN- α	interferon α
Fas-L	ligand Fas
CCL1, I-309	kemokin (motiv C-C) ligand 1
MIP-1 α , CCL3	makrofagni vnetni protein 1 α
MIP-1 β , CCL4	makrofagni vnetni protein 1 β
CCL5, RANTES	kemokin (motiv C-C) ligand 5
CCL22, MDC	kemokin (motiv C-C) ligand 22
CCL24, Eotaksin-2	kemokin (motiv C-C) ligand 24
MCP-1	monocitni atraktantni protein 1
MCP-2	monocitni atraktantni protein 2
MCP-3	monocitni atraktantni protein 3
MCP-4	monocitni atraktantni protein 4
CXCL-10, IP-10	z interferonom gama induciran protein 10
MDC	makrofagni kemokin
CXCL-1, GRO/GRO- α	kemokin (motiv C-X-C) ligand 1
CXCL-4, PF-4	trombocitni dejavnik 4
CXCL-5, ENA-78	kemokin (motiv C-X-C) ligand 5
CXCL-6, GCP-2	granulocitni kemotaktični protein 2
CXCL-7, NAP-2, PPBP	nevtrofilce aktivirajoči protein 2
M-CSF, CSF-1	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
GM-CSF, CSF-2	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik GM-CSF
AREG	epidermalni rastni dejavnik amfiregulin
ANGPT2	angiopoietin 2

2.1.4 Nastajanje krvnih celic

Hematopoeza je proces nastajanja krvnih celic. Vsak dan nastane približno 10^{13} krvnih celic, ki se sprostijo v krvni obtok, saj so nujno potrebne za vzdrževanje homeostaze celotnega telesa.

V zarodku se hematopoeza začne s pojavom **prvih celic rdeče vrste v predelu rumenjakeve vrečke** že v drugem tednu nosečnosti. V osmem tednu se hematopoeza preseli v plodova jetra, hkrati se začnejo pojavljati tudi celice bele vrste in krvne ploščice. Hematopoeza v jetrih (in nekoliko manj v vranici ter bezgavkah) doseže višek v 5. mesecu nosečnosti, nato jo postopno nadomesti hematopoeza v kostnem mozgu, kjer se krvotvorne matične celice obdržijo vse življenje (Slika 8).



Slika 8: Migracija krvotvornih celic med razvojem krvotvornega sistema.

Hematopoeza se začne z razvojem krvnih otočkov, obdanih z endotelijskimi celicami v rumenjaki vrečki. Nato se preseli v območje aortogonadalnega grebena/mezonefroza (AGM) in v jetra ploda, od koder KMC migrirajo v vranico, timus in kostni mozeg.

2.1.5 Uporaba krvotvornih matičnih celic za zdravljenje

Postopek presaditve KMC je namenjen **delni ali popolni obnovi krvotvornega sistema**. Pripravek KMC vbrizgajo v veno podobno kot kri pri transfuziji. Pri zdravljenju s celicami se lahko uporabijo avtologne ali alogenske celice. Avtologne celice so pridobljene neposredno od bolnika, alogenske pa od drugih skladnih in zdravih posameznikov (sorodni ali nesorodni darovalec). Čeprav imajo alogenske celice nekatere prednosti, je interakcija z imunskim sistemom bolnika glavna ovira za njihovo uporabo, obenem pa omogočajo t.i. učinek presadka proti levkemiji, ki je ključna komponenta za

preprečitev prvotne bolezni (angl. GVL graft vs. leukemia).

Začetki celičnih terapij segajo v petdeseta leta prejšnjega stoletja, ko so opravili prve presaditve kostnega mozga za bolnike z rakom (Preglednica 2). Prvi poizkusi so bili neuspešni zaradi nepoznavanja transplantacijskih antigenov sistema HLA, nato je leta 1959 sledila prva uspešna presaditev, ki je bila singenska. Prva zdravljenja s presaditvijo kostnega mozga so v Sloveniji izvedli že v zgodnjih 60-ih letih.

Preglednica 2: Časovnica za mejniki uporabe krvotvornih matičnih celic za zdravljenje

	1959	1968	1977	1980	1988
Zdravljenje s presajenimi celicami	Prva presaditev kostnega mozga med dvojčkoma	Prva uspešna alogenska presaditev kostnega mozga	Prva uspešna avtologna presaditev kostnega mozga	Prva presaditev KMC iz periferne venske krvi	Prva presaditev KMC iz popkovnične krvi

Zdravljenje s presaditvijo KMC se je izkazalo kot varno in učinkovito in je še danes najpogostejša vrsta zdravljenja s celicami. Kljub uporabnosti za zdravljenje nekaterih neozdravljivih bolezni, so KMC najverjetneje tudi izvor nekaterih s starostjo povezanih hematoloških bolezni.

Kot vse druge celice v našem organizmu se namreč tudi matične celice starajo. Molekularni mehanizmi, ki so udeleženi pri staranju matičnih celic, so enaki kot pri staranju somatskih celic. Staranje matičnih celic je tako posledica vpliva škodljivih kisikovih spojin (ROS), mutacij mitohondrijske DNA, mutacij jedrne DNA, krajšanja telomer, epigenetskih sprememb, sprememb mikroRNA, sprememb v spajanju RNA in ribosomov, sprememb v proteostazi, sprememb v celični polarnosti, sprememb v metabolizmu in zaznavanju hranil, sprememb v niši matičnih celic, kopičenju raznih faktorjev, ki krožijo v obtoku, celične senescence, spremenjene medcelične komunikacije.

Kot dolgožive celice lahko KMC kopičijo genetske mutacije, vključno s tistimi, ki vplivajo na hematopoezo. Hematološke bolezni, ki naj bi bile posledica mutacij v KMC, so akutne mieloične levkemije, mielodisplastični sindrom in klonska hematopoeza z nedoločenim potencialom.

2.1.6 Viri krvotvornih matičnih celic za presaditve

KMC s krvnim obtokom sicer lahko krožijo med kostnim mozgom, vranico in jetri, a se jih večina zadržuje v kostnem mozgu. **Kostni mozeg je bil do nedavnega edini vir KMC.** Danes aspiracijo kostnega mozga izvajajo redkeje, saj **KMC zbirajo predvsem iz venske krvi, kjer z afereznim postopkom bolniku oziroma darovalcu KMC izločijo jedrne celice iz krvi, ostale komponente krvi pa vrnejo v krvni obtok** (Slika 9, 10).

Leta 1989 je bil v Sloveniji izveden prvi postopek zbiranja avtolognih KMC iz periferne krvi s postopkom afereze, pri čemer uporabljamo aparturo za avtomatizirano ločevanje krvnih komponent. Leta 1994 pa je bil izveden prvi aferezni postopek zbiranja KMC pri zdravem darovalcu.



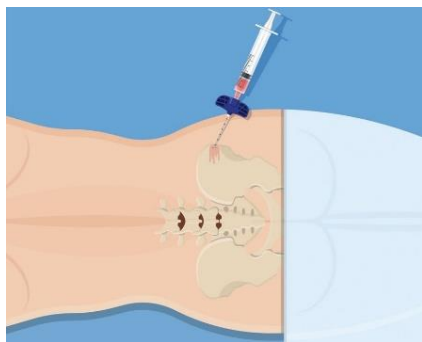
Slika 9: Zbiranje krvotvornih matičnih celic s celičnim ločevalcem.

Z afereznim postopkom iz krvi izločimo enojedrne celice, med katerimi so tudi matične celice, ter vrnemo preostale krvne celice in plazmo v krvni obtok bolnika ali darovalca.

Matične celice predstavljajo manj kot 1% celic kostnega mozga, v periferni krvi pa jih je še manj. Zato količino KMC v krvi povečamo z rastnimi dejavniki (npr. G-CSF), ki mobilizirajo KMC iz kostnega mozga v periferno kri, od koder jih zbiramo. **Prednosti presaditve KMC iz venske krvi** v primerjavi s presaditvijo KMC

iz kostnega mozga so enostavnejši ter manj invaziven postopek zbiranja celic, pri katerem hospitalizacija in splošna anestezija nista potrebni. Zbere se lahko tudi večje število KMC, saj se postopek lahko ponovi. Poleg tega je obnova krvnih celic po presaditvi KMC hitrejša. **Slabosti presaditve KMC iz venske krvi** so neželeni učinki uporabe rastnih dejavnikov za mobilizacijo celic in večje tveganje za pojav kronične bolezni presadka proti gostitelju (GVHD).

Vir KMC je tudi **popkovnična kri**, ki je zaradi majhnega celokupnega števila celic, zbranih pri enem odvzemu, uporabna predvsem za pediatrične bolnike (Slika 10). Prva presaditev KMC iz popkovnične krvi je bila opravljena leta 1988 pri otroku s Fanconijevo anemijo. Spoznanje, da ta kri vsebuje biološko dragocene KMC v zadostnem številu za uspešno transplantacijo pri otrocih, je pripeljalo do **ustanovitve bank popkovnične krvi**. Odvzem ne predstavlja tveganja za darovalce in celice so hitro dostopne, saj so trajno zmrznjene v javnih ali zasebnih bankah popkovnične krvi.



Slika 10: Odvzem matičnih celic iz kostnega mozga (levo) in zbiranje popkovnične krvi ob rojstvu (desno).

Celice iz popkovnične krvi uporabljamo tudi za bolnike, pri katerih ne najdemo ustreznega sorodnega ali nesorodnega darovalca KMC. Celice v popkovnični krvi so imunološko nedozorele, zato je **verjetnost zavrnitvene reakcije manjša in lahko uporabimo celice tkivno manj skladnih darovalcev**. KMC iz popkovnične krvi se lahko uporabljajo za zdravljenje različnih hematoloških bolezni, vključno z levkemijami, mielodisplastičnim sindromom in aplastično anemijo. Omogočajo boljše preživetje zaradi splošno nizke stopnje pojava bolezni presadka proti gostitelju (GVHD) in nizke stopnje ponovitve minimalne rezidualne bolezni (MRD) ter močnejšega učinka presadka proti levkemiji (GVL) pri MRD-pozitivnih bolnikih.

KMC iz popkovnične krvi se hitreje in večkrat pomnožujejo v primerjavi s KMC celic iz drugih virov, saj so njihove telomere daljše, ker so celice mlajše.

Popkovnična kri vsebuje tudi visoko koncentracijo celic B z imunoregulacijskimi funkcijami, ki proizvajajo IL-10 in lahko ščitijo pred kroničnim GVHD. Poleg tega so v raziskavah na mišjem modelu B-celičnega limfoma ugotovili, da celice T iz popkovnične krvi posredujejo močnejše protitumorske odzive v primerjavi s celicami T iz periferne krvi.

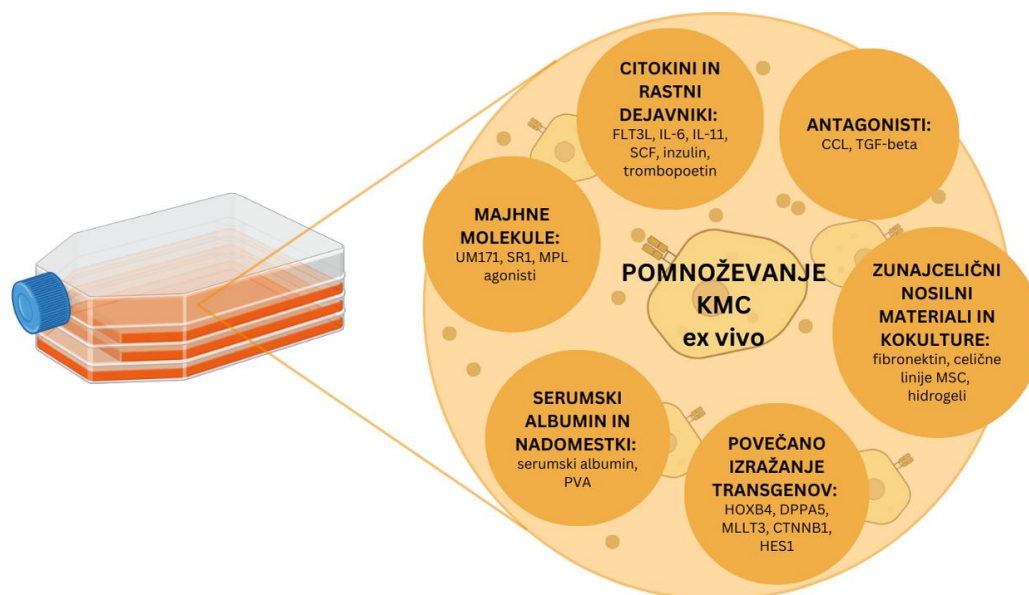
Slabša plat popkovnične krvi je omejena količina krvi, ki je na razpolago in s tem omejeno število KMC. Zato si pomagajo z različnimi pristopi, kot je združevanje oz. presaditev dveh ali več enot popkovnične

krvi, ali pomnožititev KMC *ex vivo*, kar še vedno predstavlja izziv. S povečanjem celičnega odmerka omogočimo presaditev pri odraslih bolnikih in hkrati izboljšamo prijetje presajenih celic v bolniku.

2.1.7 Celične kulture krvotvornih matičnih celic

Omejeno število KMC (npr. zaradi nezadostnega števila darovalcev popkovnične krvi, premalo mobiliziranih celic v periferni krvi, pomanjkanja ustreznih darovalcev...) bi bilo možno odpraviti z *ex vivo* pomnoževanjem KMC. Zato je optimizacija pogojev za gojenje KMC v celičnih kulturah že dolgo izziv raziskovalcev. Z zagotavljanjem ustreznih pogojev za pomnoževanje KMC se namreč ukvarjajo že več kot 50 let, pri čemer je napredek počasnejši kot bi si želeli. Poleg pomnoževanja KMC proučujejo tudi mehanizme diferenciacije v zrele krvne celice.

Razvitih je bilo več pristopov za *ex vivo* pridobivanje večje količine KMC (Slika 11). Za spodbujanje pomnoževanja KMC so testirali številne citokine in rastne dejavnike, za katere je bilo ugotovljeno, da uravnavajo samoobnovo *in vivo*. Raziskali so več majhnih molekul in agonistov, ki v kombinaciji s temi citokini in rastnimi dejavniki spodbujajo delitev in diferenciacijo KMC. Poleg **TPO** in **SCF**, znanim tudi kot Kit ligand, so tu še drugi rekombinantni proteini, kot so interleukin-3 (**IL-3**), **GM-CSF** in **eritropoetin**.



Slika 11: Različni dejavniki, ki vplivajo na pomnoževanje krvotvornih matičnih celic ex vivo.

Na delitev matičnih celic vpliva prisotnost ali odsotnost rastnih dejavnikov, citokinov, majhnih molekul, sestavine in oblike nosilnih materialov za celice in drugo. Legenda: CCL- kemokinski ligandi motiva C-C; PVA - polivinil alkohol; SCF-dejvnik matičnih celic; FLT3L- ligand FMS-podobne tirozinske kinaze 3.

Drugi pristopi za *ex vivo* pridobivanje KMC vključujejo **preprečevanje kopičenja endogenih zaviralcev samoobnavljanja, kot so transformirajoči rastni dejavnik β (TGF β) in kemokinski ligandi motiva C-C (CCL).** Različne sestavine gojilnega medija vplivajo na stabilnost KMC *ex vivo*. Nizke ravni kalcija spodbujajo vzdrževanje KMC.

Za pomnoževanje KMC v celični kulturi se že dolgo uporablja **serumski albumin**, ki ga je mogoče nadomestiti s polivinil alkoholom (PVA). Zunajcelični matriks, sestavljen iz fibronektina ali hidrogelov, in/ali kokultura z mezenhimskimi matičnimi celicami, ravno tako spodbuja samoobnovo KMC, kakor tudi prekomerno izražanje nekaterih transkripcijskih dejavnikov, kot sta npr. MLLT3 in DPPA5,

in uravnavanje signalnih poti (Notch in Wnt) (Slika 11).

2.1.8 Diferenciacija v zrele krvne celice

Diferenciacijo v različne krvne celice lahko izvedemo v laboratoriju tako, da čim bolj posnemamo okolje *in vivo*.

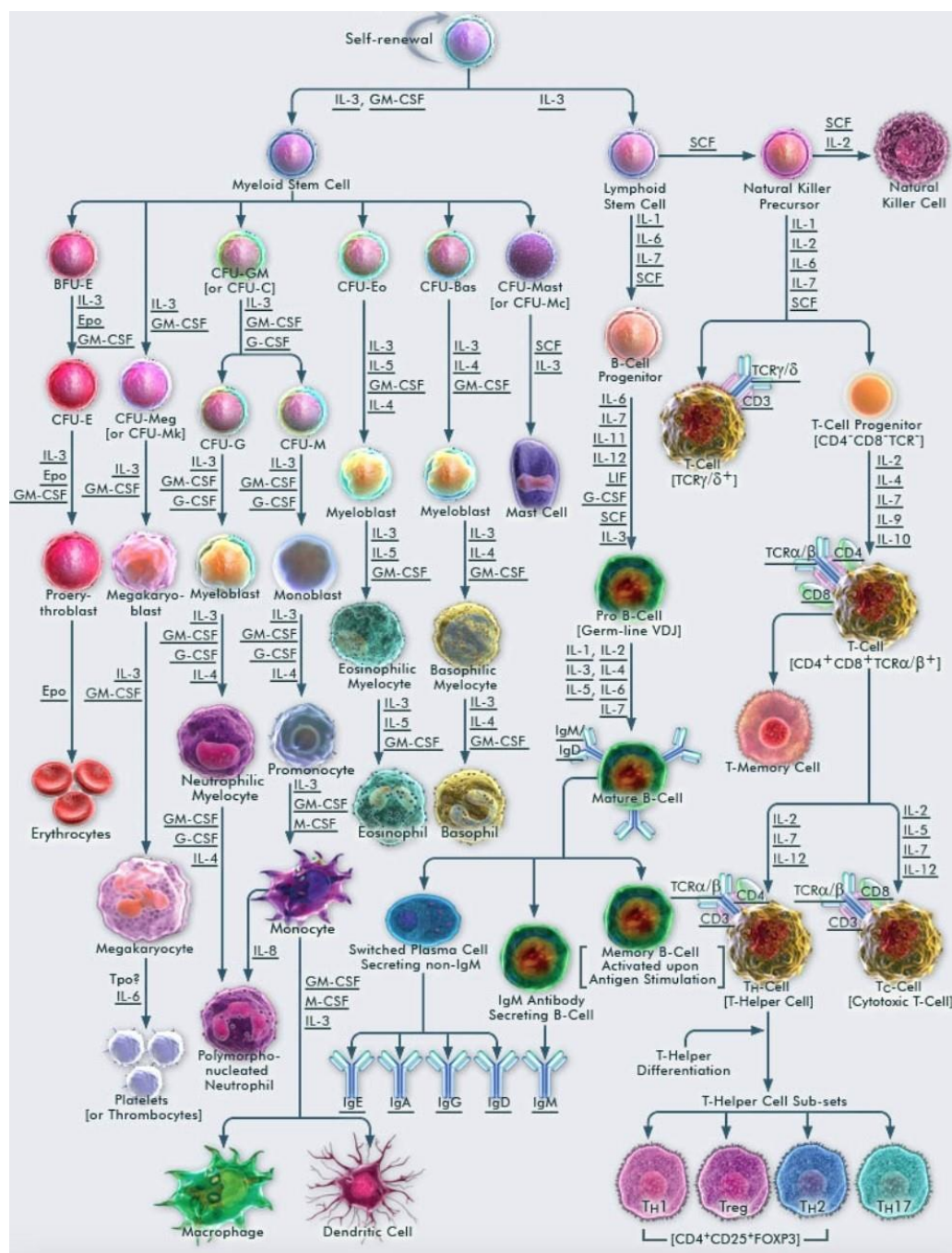
Smer diferenciacije matične in predniške celice je odvisna od prisotnosti oziroma odsotnosti ter kombinacije različnih signalov iz okolja (Slika 12). To so lahko topni proteini, ki jih izločajo sosednje ali oddaljene celice, membranski proteini sosednjih celic in molekule zunajceličnega matriksa. Na Sliki 12 so prikazane številne bioaktivne molekule, ki vplivajo na razvoj predniških celic in nadalje specializiranih celic.

Rdeče krvne celice ali eritrociti so najštevilčnejše krvne celice, saj jih pri

odraslih osebah vsako sekundo nastane približno 2×10^6 . **Trombociti** so primarno zadolženi za strjevanje krvi, poleg tega pa predstavljajo vir številnih vnetnih in rastnih dejavnikov, pomembnih pri okvari tkiv in vnetju. Celice bele vrste ali **levkociti** so celice imunskega sistema, ki so pomembne za obrambo organizma pred okužbami in drugimi tujki. Mednje sodijo granulociti, monociti /makrofagi, dendritične celice, naravne celice ubijalke (NK) in limfociti. Granulociti so celice pridobljene imunosti s kratko življensko dobo (2-3 dni). Nevtrofilci so fagociti in prve celice, ki se pojavijo na vnetišču. Eozinofilci so celice, ki napadajo in uničujejo parazite, sodelujejo pa tudi pri alergijskih reakcijah. Bazofilci sodelujejo pri vnetju in pri alergijskih reakcijah.

Monociti preko žilnega endotelija vstopijo na področje vnetja, kjer se diferencirajo v makrofage, ki nato s fagocitozo in tvorbo reaktivnih kisikovih spojin odstranjujejo in uničujejo mikroorganizme in druge tujke.

Dendritične celice se v nezreli obliki nahajajo v tkivih. Po fagocitozi antigenov, predelane peptide vežejo na molekule HLA, izražene na njihovi površini, pri tem pa dozori in potuje v bezgavke, kjer aktivirajo druge imunske celice. Naravne celice ubijalke so celice prirojene imunosti in prepoznavajo in odstranjujejo spremenjene celice organizma, npr. rakave in celice, okužene z virusi. Limfociti so celice pridobljene imunosti, ki nenehno krožijo med tkivi, limfatičnim sistemom in krvjo. Limfociti T nastajajo v kostnem mozgu in zorijo v priželjcu. Limfociti B nastajajo v kostnem mozgu, nato pa zorijo deloma v kostnem mozgu, večinoma pa v vranici. Limfociti migrirajo v periferne limfatične organe, kjer jih antigeni aktivirajo in sproži se klonska ekspanzija. Limfociti T s svojimi klonsko porazdeljenimi T- celičnimi receptorji (TCR) prepoznavajo antigene na površini antigen predstavljajočih celic.



Slika 12: Nastajanje krvnih celic poteka postopoma preko linijsko usmerjenih predniških celic. Procese regulirajo hormoni, rastni dejavniki, citokini in drugi dejavniki v okolici celic.

2.1.8.1 Uporaba zrelih krvnih celic

Poleg uporabe KMC je uporaba že diferenciranih krvnih celic zanimiva za področje transfuziologije. **Transfuzija je prenos alogenskih celic ali krvne plazme v krvni obtok prejemnika.** Prebivalstvo se stara in naraščajoče potrebe po transfuziji

bodo zahtevale nove pristope pri preskrbi s krvjo in eden izmed njih je pridobivanje krvnih celic *ex vivo*. Tehnologija za pridobivanje nekaterih krvnih celic je sicer že na voljo, vendar še ne omogoča pridobivanje zadostne količine in enako učinkovitih celic, kot so celice krvodajalcev.

2.1.8.2 Eritrocitna diferenciacija ex vivo

Transfuzija eritrocitov se običajno uporablja pri zdravljenju krvavitev, talasemije, kronične aplastične anemije in anemije, povzročene s kemoterapijo/radioterapijo, uporablja pa se tudi kot podporno zdravljenje za vrsto genetskih, avtoimunskih in neoplastičnih bolezni. **Povpraševanje po eritrocitih še naprej narašča zaradi vse večjega bremena kroničnih bolezni, pri čemer je ključno staranje prebivalstva.**

S pridobivanjem eritrocitov v laboratoriju bi tako v prihodnosti lahko zagotovili velike količine zrelih (brezjedrnih) eritrocitov z odraslim hemoglobinom in **univerzalno krvno skupino 0, RhD negativno**. Obenem pa bi se **izognili imunskim zapletom in alergijskim reakcijam po transfuziji, saj celični produkt ne bi vseboval levkocitov, levkocitnih protiteles ter plazemskih beljakovin krvodajalca**. Ob tem tudi ne bi bilo nevarnosti prenosa virusov, bakterij, zajedalcev ter okužb, ki se pojavljajo zaradi globalizacije ter sprememb podnebja (malarija, denga, čikungunja, WNV, itd.). Biotehnologija eritrocitov bi bila zelo koristna tudi za bolnike, ki dobivajo mnogo transfuzij in lahko posledično razvijejo protitelesa proti eritrocitom. Zagotavljanje skladnih eritrocitov je namreč za to skupino imuniziranih bolnikov težavno, saj med pripravo transfuznih enot ne testiramo vseh eritrocitnih antigenskih sistemov ampak le tiste najbolj imunogene, kot je na primer sistem ABO. Z gojenimi eritrociti bi tako lahko zagotovili antigensko skladno kri, saj bi jo pridobili iz skladnih KMC.

Nastajanje eritrocitov regulira hormon **eritropoetin**, ki se izloča iz ledvic, kadar v krvi pade parcialni tlak kisika. Iz matičnih celic usmerjenih v rdečo vrsto nastajajo predhodniki eritrocitov – **eritroblasti** (Slika 13). **Eritroblasti se med dozorevanjem manjšajo, citoplazma postaja vse bolj acidofilna** zaradi sinteze hemoglobina (Hb). Ko eritroblasti **izločijo jedro**, nastanejo nezreli eritrociti, ki jih imenujemo **retikulociti**. Ti so nekoliko večji kot eritrociti in še vedno vsebujejo ostanke RNA. Retikulociti še nekaj časa ostanejo v kostnem mozgu, nato pa se izplavljajo v kri, kjer v približno 24 urah izgubijo RNA in dozorejo v eritrocite. Zrel eritrocit preživi v obtoku približno 120 dni.

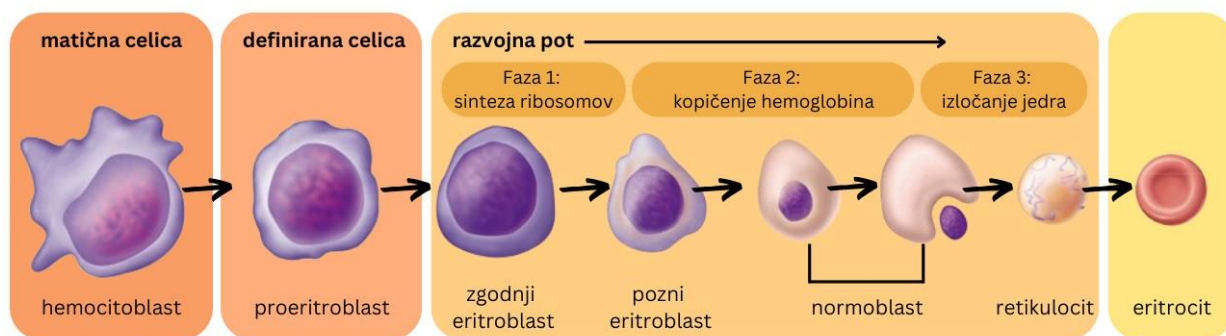
Za diferenciacijo zrelih eritrocitov iz KMC *ex vivo* se uporabljajo kombinacije citokinov in/ali stromalnih celic v kokulturi. Eritrocite se identificira s pomočjo izražanja eritroidnih markerjev **glikoforina A (CD235a), transferinskega receptorja (CD71) in/ali Rhesus antigena (RhD) v kombinaciji z morfološko analizo z obarvanjem po May-Grünwald-Giemsi**.

Eden od prvih laboratorijskih postopkov za eritroidno diferenciacijo je 3-stopenjski postopek s specifičnimi kombinacijami citokinov v gojišču brez seruma, ki omogoča proizvodnjo eritroidnih predniških celic sposobnih končnega zorenja po presaditvi v miši z imunsko pomanjkljivostjo. *In vitro* zorenje in enukleacija eritroblastov sta bili prvič doseženi s kombinirano uporabo citokinov in kokulture z MSC. Kmalu zatem so bile razvite tudi metode brez podpornih celic.

Pridobivanje večjih količin zrelih in klinično uporabnih eritrocitov še vedno predstavlja izziv. Rezultati študij ksenotransfuzije so pokazali, da je obsežno pridobivanje (sistem celične kulture v steklenički) funkcionalnih enukleiranih eritrocitov iz

KMC, pridobljenih iz popkovnične krvi, primerno in varno za uporabo.

Prvo klinično preizkušanje eritrocitov, pridobljenih iz KMC darovalca, je bilo izvedeno šele pred kratkim (ISRCTN42886452).



Slika 13: Shematični prikaz nastanka eritrocita iz krvotvorne matične celice.

2.1.8.3 Megakariocitna diferenciacija in pridobivanje trombocitov *ex vivo*

Trombociti nastanejo v procesu trombopoeze iz megakariocitov, največjih celic v kostnem mozgu, ki zapustijo kostni mozeg in obtičijo v pljučnih kapilarah (Slika 9). Tu 30-100 μm megakariociti razpadejo na krvne ploščice ali trombocite velikosti 1,5-3,5 μm . Trombociti v krvnem obtoku preživijo 8-10 dni, nato jih odstranijo makrofagi. Nastajanje trombocitov omogoča hormon TPO (Slika 14).

Megakariociti, ki proizvajajo trombocite, so redka vrsta krvnih celic, ki predstavljajo le 0,01 % vseh celic z jedri v kostnem mozgu, zaradi česar jih je težko izolirati in gojiti. Trombociti igrajo pomembno vlogo pri hemostazi, trombozi, vnetju, zoženju in obnavljanju žil, vendar imajo življenjsko dobo le do 10 dni in zato jih mora telo

stalno proizvajati. Nezmožnost vzdrževanja ravni trombocitov vodi v pomanjkanje trombocitov ali trombocitopenijo.

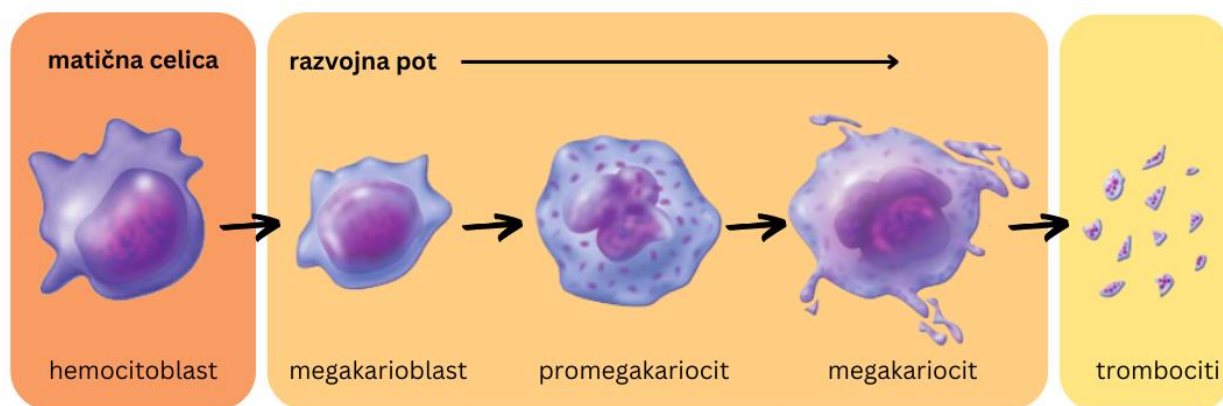
Trombocitopenijo običajno opazimo pri hematoloških boleznih, vključno s aplastično anemijo, levkemijo in nepravilnostmi kostnega mozga, lahko pa nastane tudi zaradi infekcijskih bolezni, bolezni vezivnega tkiva in jeter ter kemoterapije/radioterapije. Transfuzija trombocitov je učinkovito zdravljenje, ki zmanjša umrljivost zaradi krvavitve v stanjih trombocitopenije. Trombociti, ki se trenutno uporabljajo v klinični praksi, so pridobljeni izključno od darovalcev, z razvojem novih možnosti kliničnega zdravljenja pa se povpraševanje po transfuziji trombocitov povečuje. Zato so postali zanimivi alternativni načini za

pridobivanje trombocitov, vključno s proizvodnjo trombocitov *in vitro*.

Megakariociti nastanejo iz KMC s postopnim procesom diferenciacije. Razvili so različne laboratorijske postopke za diferenciacijo megakariocitov, ki jih običajno identificiramo s pomočjo označevalca trombocitov **glikoproteina IIb/IIIa (CD41) in glikoproteina Ib (CD42b) in/ali z določanjem ploidnosti celic**. Protokoli za proizvodnjo megakariocitov iz KMC ne zagotavljajo dovolj učinkovite diferenciacije, stroški proizvodnje pa so visoki. Učinkovitost diferenciacije se izboljša z uporabo citokinov, kot je **TPO**, za katerega se je izkazalo, da ima najmočnejši vpliv na diferenciacijo megakariocitov.

Lahko se uporablja sam ali v različnih kombinacijah s **SCF, IL-3 in IL-6**. Zanimivo je, da povišana temperatura pozitivno vpliva na diferenciacijo KMC v megakariocite. Vzdrževanje kulture pri 39 °C je namreč spodbujalo proliferacijo in učinkovitost diferenciacije megakariocitov ter izboljšalo proizvodnjo trombocitov.

V zadnjem času so bili razviti klinični protokoli za generiranje megakariocitov iz KMC, pridobljenih iz popkovnične krvi, z uporabo človeškega albumina in definirane koktajla citokinov in dodatkov. Metode 3D kulture (sistem celične kulture valjčne steklenice) so se izkazale za najbolj učinkovite.



Slika 14: Shematični prikaz nastanka trombocitov

2.1.9 Analize krvotvornih matičnih celic

V začetkih uporabe KMC za zdravljenje so **koncentracijo KMC ocenili s pomočjo podatka o koncentraciji vseh celic oziroma vseh jedrnih celic v pripravku za presaditev**. Ta povezava temelji na predpostavki, da se ob povečanju celokupnega števila celic poveča tudi

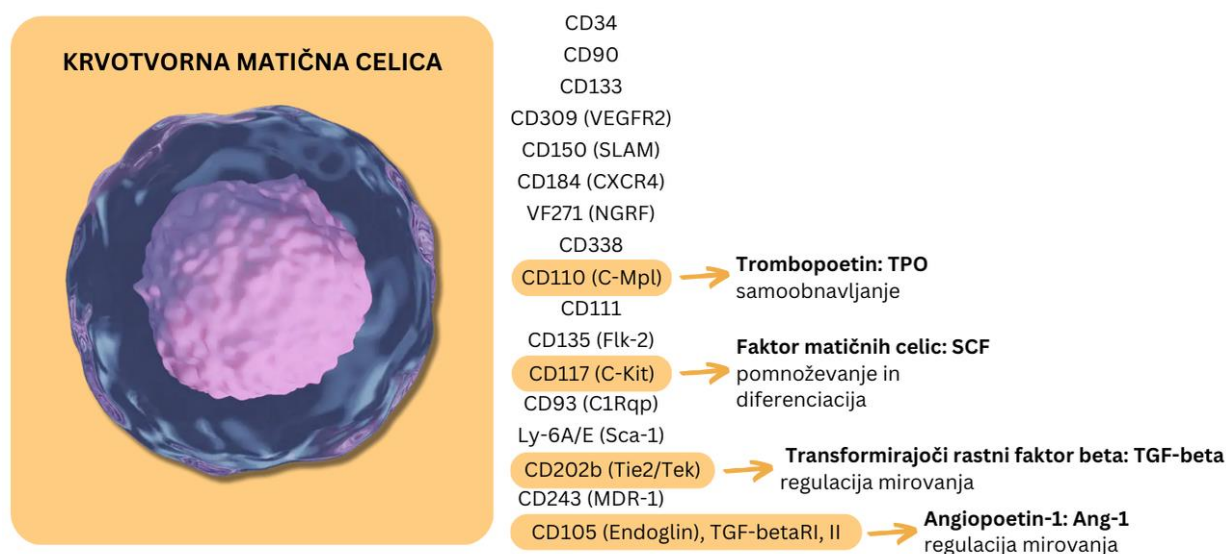
število krvotvornih matičnih in predniških celic. Potrdili so, da se ti podatki v veliki meri ujemajo z uspešnostjo presaditve KMC. Kasneje so s funkcionalnimi testi ocenili, da je pogostost KMC ena na 10 000 celic v kostnem mozgu, a zaradi dolgotrajnosti ta funkcionalni test (glej dalje) ni primeren za rutinsko uporabo.

2.1.9.1 Fenotipske analize krvotvornih matičnih celic

Koncentracijo različnih celic v krvi določamo s **hematološkimi analizatorji**. Krvne celice štejejo in merijo njihove lastnosti s pomočjo električnih ali optičnih načinov detekcije ali s kombinacijo obeh načinov. Hematološki analizator žal ni primeren za določanje KMC. **Zato je šele odkritje, da krvotvorne matične in predniške celice na površini izražajo molekulo CD34, omogočilo njihovo neposredno prepoznavanje in štetje.** Antigen CD34 je transmembranski glikoprotein velikosti 104–120 kDa, ki pripada adhezijskim molekulam sialomucinom. Celice, označene s protitelesi proti antigenu CD34,

analiziramo s **pretočnim citometrom**. Da bi se štetje KMC čim bolj standardiziralo, je združenje International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) predlagalo enoten postopek za označevanje celic CD34+ v različnih vzorcih (periferna kri, kostni mozeg, popkovnična kri) ter postopek za njihovo večstopenjsko analizo z metodo pretočne citometrije. **Uporaba pretočne citometrije je trenutno edini standardiziran način določanja koncentracije matičnih celic.**

Prednost te metode je hitrost izvedbe in natančnejša napoved terapevtskega potenciala celičnega pripravka. Vendar se izražanje molekul CD34 lahko spreminja, npr. če so celice izpostavljene različnim pogojem *ex vivo*.



Slika 15: Nekateri membranski označevalci celične pripadnosti in molekule, ki vplivajo na stanje krvotvorne matične celice.

Dozorevanje krvne celice je natančno kontrolirano z izražanjem specifičnih genov in njihovih produktov, kar se odraža na morfoloških in funkcionalnih spremembah celice (sledenje diferenciaciji

in vitro). Testi *in vitro* so pokazali, da je **populacija celic CD34+ heterogena in da z določanjem kombinacije specifičnih molekul na površini celic lahko ločimo subpopulacije KMC med seboj** (Slika 15).

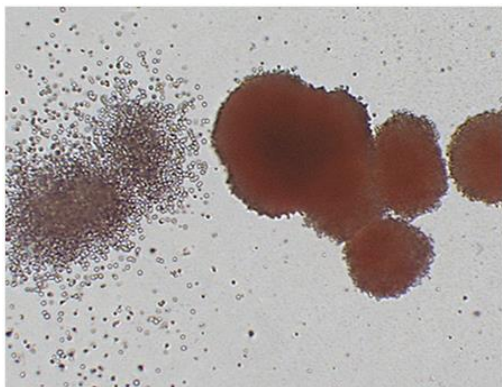
Prvi označevalec celične pripadnosti za KMC je bil CD34, ligand za L-selektin, ki ga izraža 0,5–5 % krvnih celic v jetrih človeških plodov, popkovnični krvi in kostnemu mozgu odraslih. Za KMC so značilni tudi drugi celični označevalci. Človeške KMC lahko izražajo CD31, CD34, CD45, CD133, CD117, CD90, CD184 in druge.

Prvim izoliranim KMC so določili fenotip CD34+CD90+Lin-, kjer Lin- pomeni, da ne vsebujejo specifičnih markerjev za limfocite T in B, NK in mieloeritroidno linijo. Te celice so ustvarile limfoidno in mieloidno potomstvo tako v *in vitro* testih kolonij kot *in vivo* SCID (huda kombinirana imunska pomanjkljivost) miših; nasprotno pa preostala populacija celic CD34+CD90-Lin- ni mogla ustvariti celičnih klonov, ki vsebujejo mieloidne in limfoidne vrste celic. Nadaljnja analiza KMC znotraj populacije CD34+ je pokazala izražanje površinskega markerja CD38 in nato so s pomočjo drugih označevalcev odkrili različne subpopulacije KMC. **Ugotovili so, da je zbiranje človeških KMC iz periferne krvi, mobilizirane z G-CSF, na podlagi koekspresije CD34 in CD90, dejansko izboljšalo učinkovitost presaditve.**

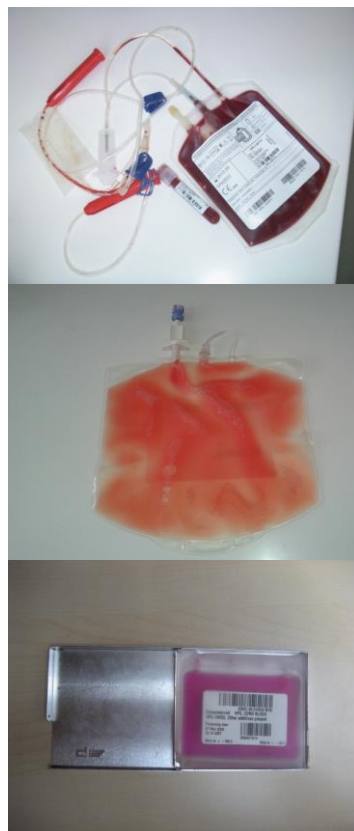
V bodoče bi lahko v mešanici KMC s kombinacijo različnih označevalcev s pomočjo celičnega sorterja ali z imunoselekcijo v magnetnem polju izločili subpopulacije KMC z najprimernejšimi proliferacijskimi in diferenciacijskimi lastnostmi celic za določeno zdravljenje.

2.1.9.2 Funkcijske analize krvotvornih matičnih in predniških celic

KMC lahko dodatno identificiramo z enim od funkcijskih testov, s katerim določimo njihove migracijske, proliferacijske ali diferenciacijske sposobnosti. V raziskovalne namene ali v okviru kontrole kakovosti celičnih pripravkov za presaditev najpogosteje merimo število funkcionalnih KMC, sposobnih tvorbe kolonij. **To so klonogeni ali CFU (angl. Colony-Forming Unit) testi. Vsaka kolonija namreč nastane iz ene predniške celice ali ene CFU. Nastajajoče kolonije lahko spremljamo *ex vivo* ali *in vivo*.** V klasičnem CFU-testu pripravimo celično kulturo v petrijevki z gojiščem, ki vsebuje ustrezne rastne dejavnike za KMC. Kolonije dosežejo določeno velikost in obarvanost v 14–21 dneh, takrat so primerne za opazovanje in štetje pod mikroskopom. Poznamo različne klonogene teste: BFU-E (angl. Burts Forming Unit Erythroid), CFU-GM (angl. Colony Forming Unit Granulocyte/Macrophage) (Slika 16), CFU-GEMM (angl. Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Macrophage/ Megakaryocyte), CFU-S (angl. Colony Forming Unit Spleen), ki v obsevanih miših v vranici tvorijo mieloidne kolonije in LTC-IC (angl. Long-Term CultureInitiating Cells). Testi za CFU-S in testi prijetja presadka v NOD/SCID miših so zahtevnejši, zato se uporabljajo predvsem v raziskavah. Za ostale pripravke uporabljamo CFU-test; pri KMC, namenjenih za presaditev ga uporabljamo občasno, na primer za preverjanje ustreznosti postopkov obdelave celic in shranjevanja v tekočem dušiku (Slika 17).



Slika 16: S CFU-GM testom opazujemo kolonije granulocitov (levo), s CFU- E testom pa kolonije eritrocitov (desno).



Slika 17: Pripravki krvotvornih matičnih celic.

Svež pripravek krvotvornih matičnih celic po citaferezi (levo). Zamrznjene krvotvorne matične celice (sredina). Zamrznjene krvotvorne matične celice iz popkovnične krvi (desno).

2.2 ENDOTELIJSKE PREDNIŠKE CELICE

Skoraj vsa tkiva so odvisna od prekrvavitve, dostava krvi pa je odvisna od prepletene strukture žil in žilic, ki jih sestavljajo endotelijske celice. **Endotelijske žilne celice so specializirane epitelne celice, ki obdajajo lumen žil.** Endotelijske celice so fenotipsko zelo heterogena populacija, razlikujejo se glede na tip žile, ki jo sestavljajo (arterija ali vena), razlikujejo se tudi med tkivi in organi.

Poleg KMC in predniških celic krvnih celic se tako v krvi nahajajo tudi **endotelijske predniške celice (EPC)**, ki se izplavljajo iz kostnega mozga v periferno kri, po kateri potujejo na mesto poškodbe žile, potem ko se odzovejo na signale iz okolja. Signale oddajajo različne celice, kot so endotelijske celice, celice gladkih mišic, kardiomiociti. Nato se EPC vgradijo v novo nastajajočo (ali poškodovano) žilo in se diferencirajo z zrele endotelijske celice. Natančni mehanizmi, s katerimi EPC sodelujejo pri tvorjenju novih žil, še niso popolnoma jasni.

Ker so EPC ključne za nastajanje in obnovo žil, so pomembne celice tudi za celične terapije, predvsem na področju tkivnega inženirstva, saj zagotavljajo preskrbo s kisikom in hranili celicam v nastajajočem tkivu. Endotelijske predniške celice so bile v periferni krvi odraslega prvič opisane leta 1997, kar je ovrglo paradigmo o tem, da je vaskulogeneza omejena le na embrionalni razvoj. V krvi so bile zaznane celice, ki na svoji površini izražajo označevalec pripadnosti **CD34**, **receptor vaskularnega endotelijskega faktorja 2 (VEGFR 2)**. Večina endotelijskih predniških celic, ki kroži v krvi, nastane v kostnem mozgu, kjer so v tesni povezavi s krvotvornimi matičnimi celicami, z njimi imajo skupnega prednika - **hemangioblast**.

2.2.1 Celične kulture endotelijskih celic

EPC so heterogena populacija celic in jih glede na njihovo morfologijo, funkcijo in rastni potencial delimo vsaj na dve različni populaciji v *ex vivo* celičnih kulturah:

Zgodnje EPC tvorijo kolonije. Pojavijo se po 4-7 dneh gojenja v celični kulturi s fibronektinom, **so vretenaste oblike in imajo omejen proliferativni potencial**. Zgodnje EPC pa preko izločanja vazoaktivnih substanc, kot so citokini, stromalni celični faktor-1 (SDF-1/CXCR4), dušikov oksid in prostaglandin I₂ vplivajo na nastanek endotelija in novega žilja.

Pozne EPC se pojavijo po 2-3 tednih gojenja v celični kulturi s kolagenom in so **poligonalnih oblik**. Pozne EPC so fenotipsko bolj podobne endotelijskim zrelim celicam.

V krvi predstavljajo endotelijske celice le 0,002 – 0,02 % celic izmed vseh enojedrnih celic. Vendar raziskave kažejo, da so endotelijske celice in endotelijske predniške celice, ki jih določimo v vzorcu krvi, obetavni pokazatelji endotelijske poškodbe oziroma regeneracijske sposobnosti žilja. Maloštevilstvo celic in pomanjkanje specifičnih označevalcev pa sta ključna razloga za to, da je njihova identifikacija in izolacija zahtevna. EPC in zrele celice se med seboj razlikujejo v izražanju celičnih označevalcev CD133, ki se tekom diferenciacije v zrele celice preneha izražati, ter CD45, ki je šibko izražen na EPC, na zrelih celicah pa ga ni. Označevalec celične pripadnosti CD133 je značilen tudi za KMC, prav tako kot CD34. Endotelijse celice izražajo označevalce CD146, CD31, VEGFR2, CD144, ne pa CD45, CD3.

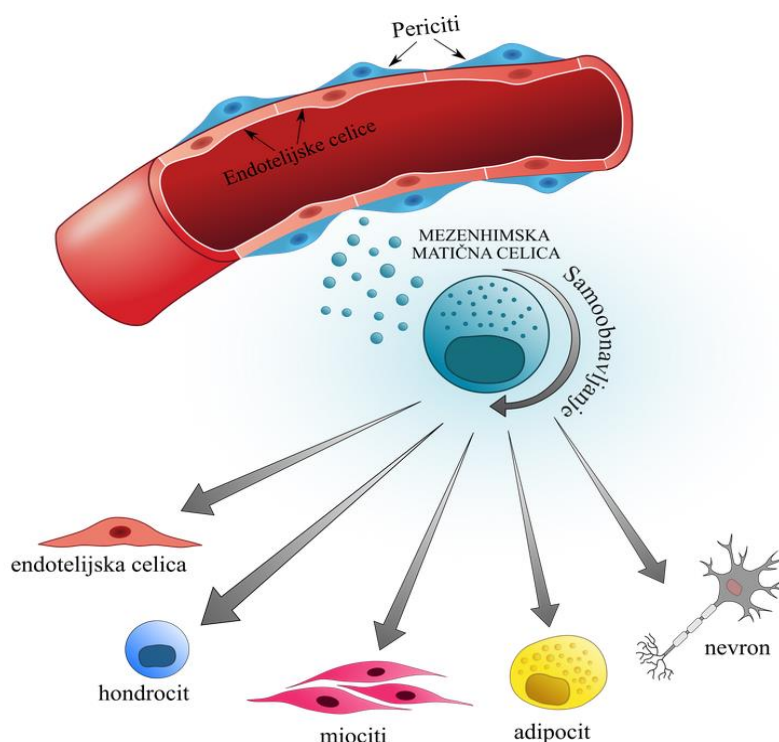
2.3 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

2.3.1 Splošne lastnosti mezenhimskih matičnih celic

Mezenhimske matične celice (Mesenchymal Stem/Stromal Cells ali MSC) poleg **nadomeščanja diferenciranih celic v nekrvotvornih tkivih** opravljajo še številne druge funkcije v telesu, kot so

vzdrževanje homeostaze KMC v kostnem tkivu, spodbujanje celjenja in regeneracije tkiv različnih organov itd. (Slika 18).

MSC so heterogena populacija celic, ki se med seboj razlikujejo v proliferacijskih in diferenciacijskih sposobnostih ter drugih bioloških lastnostih. Nahajajo se namreč v nišah različnih tkiv, kjer mikrookolje vpliva na njihovo aktivnost in lastnosti.



Slika 18: Lastnosti mezenhimske matoične celice.

Mezenhimska matična celic se lahko diferenciacira v različne celice in neposredno ali s sproščanjem bioaktivnih molekul vpliva na druge celice.

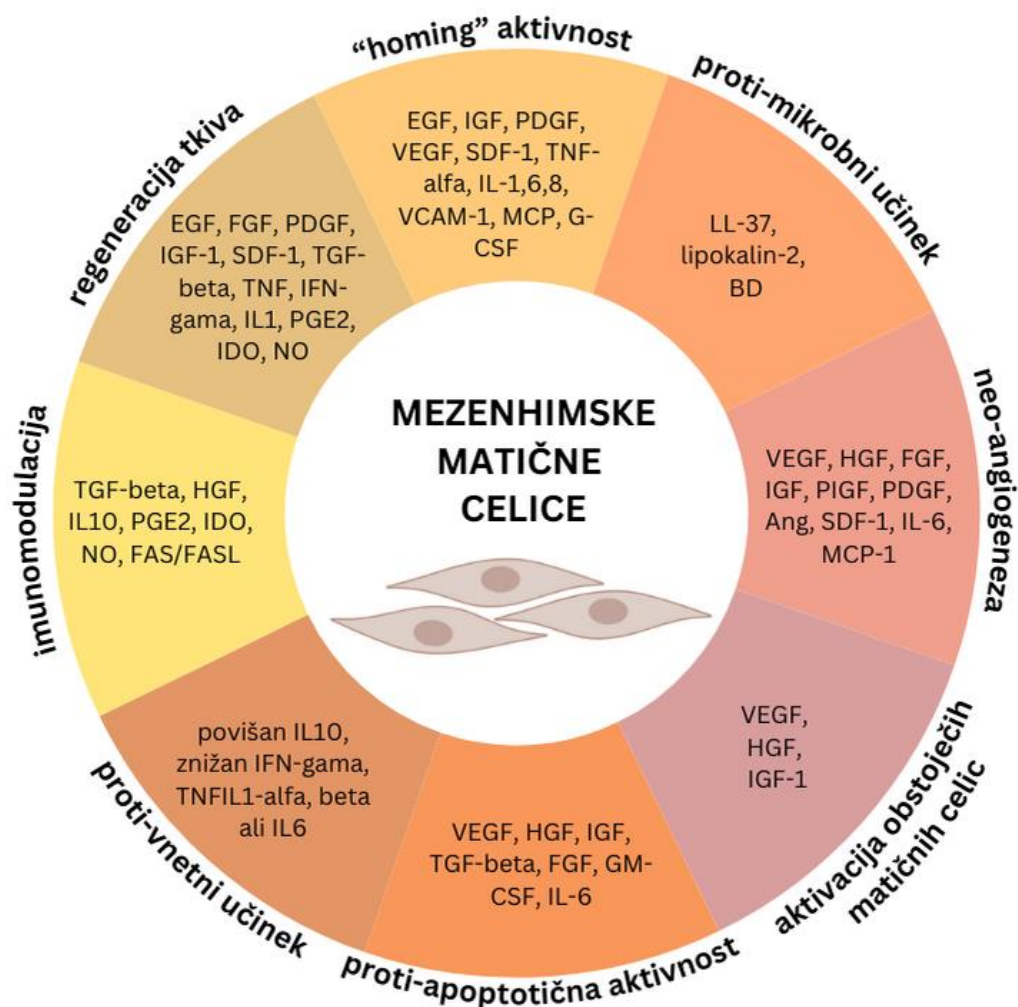
Sposobnost samoobnavljanja in multipotentnost MSC omogoča njihovo uporabo za zdravljenje različnih kliničnih stanj. **Sprva je veljalo, da so terapevtski učinki presajenih MSC posledica njihove migracije in diferenciacije v ciljnim tkivu. Veliko raziskav je kasneje pokazalo, da imajo MSC biološke in regenerativne učinke predvsem zaradi molekul, ki jih**

proizvajajo in s katerimi vplivajo na ostale matične celice ali druge celice (Slika 18, 19). MSC namreč izločajo številne interlevkine, encime, hormone in membransko vezane molekule, kamor spadajo predvsem proteini družine B7, s katerimi vplivajo na številne procese, npr. **uravnavajo celično proliferacijo in diferenciacijo, imajo protivnetne učinke,**

vplivajo na angiogenezo – proces rasti novih krvnih žil, **vplivajo na imunski sistem ter sodelujejo v postopkih regeneracije tkiv pri vnetjih ali poškodbah** (Slika 19). Med dejavniki, ki zavirajo imunski sistem ter vplivajo na vnetne odzive, so prostaglandin E2 (PGE2), indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO) in dušikov oksid (NO) (Preglednica 5). **Zaradi imunomodulatornih lastnosti lahko MSC uporabimo za terapijo pri boleznih, kot so bolezen presadka proti gostitelju (GVHD),**

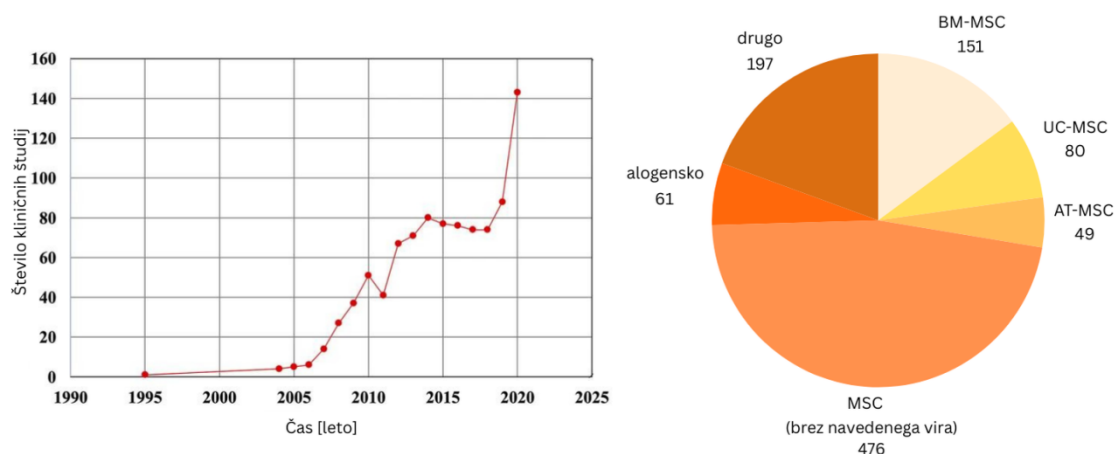
Crohnovi bolezni, diabetesu tipa 1 in mnogih drugih. MSC lahko modulirajo številne funkcije aktiviranih celic T in B, naravnih celic ubijalk (NK), dendritičnih celic (DC) in makrofagov.

Čeprav so se MSC za zdravljenje začele uporabljati šele nekaj desetletij po začetku uporabe KMC, število kliničnih študij s temi celicami trenutno presega število študij z KMC in drugimi matičnimi celicami (Slika 20).



Slika 19: Prikaz vpliva mezenhimalskih matičnih celic na procese v telesu.

Kratice: IL, interlevkini; IFN γ , interferon- γ ; TNF- α , faktor tumorske nekroze α ; TGF, transformacijski rastni dejavnik; BD, beta defenzini; EGF, epidermalni rastni dejavnik; IGF, inzulinu podoben rastni dejavnik; FGF, rastni faktor fibroblastov; HGF, faktor rasti hepatocitov; PDGF, trombocitni rastni dejavnik; VEGF, vaskularni endotelijski rastni dejavnik; SDF-1, dejavnik 1, pridobljen iz stromalnih celic; Ang, Angiopoetin; MCP, protein kemoatraktanta monocitov; GM-CSF, granulocitno-makrofagni kolonijo stimulirajoči faktor; IDO, indoleamin 2,3-dioksigenaza; NO, dušikov oksid; PGE2, prostaglandin E2; LL37, humani katelicidin.



Slika 20: Pregled registriranih kliničnih študij z mezenhimskimi matičnimi celicami.

Levo: Prikaz letnih registriranih kliničnih študij z MSC na spletni strani ClinicalTrials.gov od prve študije leta 1995 do leta 2020. Desno: Prikaz števila kliničnih študij glede na vire celic: BM-MSK – celice iz kostnega mozga, UC-MSK – celice iz popkovnične krvi, AT-MSK – celice iz maščevja. Drugo se nanaša na celice, pridobljene iz placente, zobne pulpe in druga tkiva.

2.3.2 Zgodovina raziskovanja mezenhimskih matičnih celic

Da so nehematopoetske matične celice prisotne v kostnem mozgu in da bi te celice lahko bile vir fibroblastnih celic, vključenih v proces obnove rane, je že leta **1967** ugotavljal patolog Cohnheim. Vendar pa so šele stoletje kasneje izolirali celice iz tkiva in jih gojili *in vitro*. Friedenstein in

njegovi sodelavci so med gojenjem celic iz kostnega mozga podgan ugotovili, **da se populacija nekrvotvornih celic pritrdi na dno plastične gojilne posode in da sferične celice med gojenjem pridobijo fibroblastno obliko** (Slika 21). Te celice so bile kasneje označene kot enote, ki tvorijo kolonije fibroblastov (Colony-Forming Units Fibroblasts; CFU-F).



Slika 21: Izolacija mezenhimskih matičnih celic iz kostnega mozga.

Vzorec kostnega mozga prenesemo v gojilno posodo z gojiščem – mezenhimske matične celice se pritrdijo na podlago in začnejo pomnoževati.

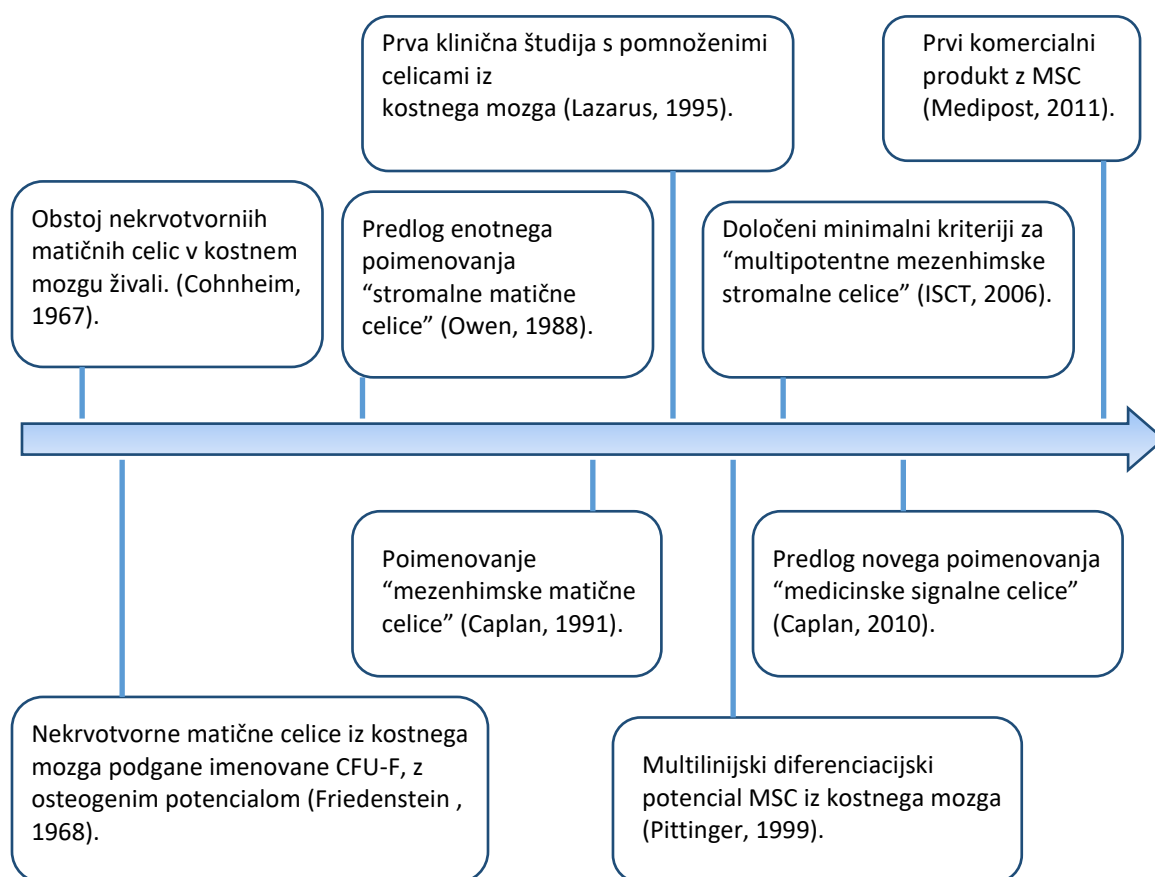
Nadalje so ugotovili, da so **te celice poleg samoobnavljanja sposobne tudi diferenciacije *in vitro* v druge vrste celic (adipociti, hondrociti in osteoblasti) in da sodelujejo pri hematopoezi.**

Leta 1988 je Owen vpeljal koncept »stromalnega sistema« s »**stromalno matično celico**«. Kasneje je Caplan kot alternativo za stromalne ali osteogene matične celice iz kostnega mozga predlagal izraz »**mezenhimska matična celica**« (Mesenchymal Stem Cells; MSC) in ta izraz se kljub nekaterim nasprotovanjem ohranja do danes (Slika 22).

Čeprav je kostni mozeg še vedno najpogostejši vir MSC, so jih s časom začeli pridobivati tudi iz **maščobnega tkiva** (Slika 23,24), **sinovialne membrane, tkiva popkovnice, popkovnične vene, popkovnične krvi in zobne pulpe, njihovo prisotnost pa so potrdili že v skoraj vseh tkivih.**

Zaradi nekaterih lastnosti MSC, kot so njihova enostavna izolacija in pomnoževanje, pa tudi multipotentnost *in vitro*, so MSC dokaj hitro postale **obetavno terapevtsko sredstvo v regenerativni medicini**. Prva poročila o klinični uporabi MSC so se pojavila med letoma 1995 in 2000 za zdravljenje bolnikov z rakom in boleznijo osteogenesis imperfecta. Rezultati so takrat pokazali predvsem

izvedljivost in varnost takega načina zdravljenja. **Predpostavljalo pa se je, da je bistvo terapevtskega potenciala MSC njihova diferenciacijska sposobnost oziroma nadomeščanje poškodovanih celic.** Vendar so kmalu ugotovili, da **presajene MSC v človeškem telesu preživijo le kratek čas in da so njihove diferenciacijske sposobnosti *in vivo* omejene.** Kljub temu so opazili terapevtske učinke, in to tudi po propadu presajenih celic. Predvidevali so, da je **glavni terapevtski učinek MSC povezan z njihovimi imunomodulatornimi in drugimi učinki, ki so posledica izločanja bioaktivnih molekul.** Leta 2002 je bilo prvič ugotovljeno, da so MSC sposobne vplivati na imunski sistem. Opazili so zaviralni učinek MSC na proliferacijo limfocitov *in vitro*. Poznejše študije na živalskih in človeških modelih so pokazale, da lahko zavirajo delovanje imunskega sistema in vplivajo tako na celice prirojenega kot na celice pridobljenega imunskega sistema. **MSC izražajo nizke ravni HLA razreda I (angl. human leukocyte antigen class I), HLA razreda II molekul in kostimulatornih molekul, kot so CD40, CD80, CD83, CD86 ali CD154, zaradi česar so nizko imunogene.** Te molekule so namreč pomembne za aktivacijo antigen specifičnih celic T. Leta 2010 je Caplan za MSC predlagal novo poimenovanje, in sicer **„medicinske signalne celice“ (MSC).**



Slika 22: Glavni mejniki raziskovanja, poimenovanja in terapevtske uporabe MSC.

V zadnjih 15 letih so regenerativni ali imunomodulatorni potencial MSC raziskovali v številnih kliničnih študijah za zdravljenje hematoloških, vnetnih in avtoimunskih bolezni; bolezni presadka proti gostitelju, bolezni srca, jeter, ledvic, pljuč, in številnih drugih. Poleg avtologne presaditve so MSC primerne tudi za alogensko presaditev, kar naj bi omogočala odsotnost molekul HLA razreda II na njihovi površini.

Različni postopki izolacije in gojenja MSC ter posledično težavna primerjava rezultatov, pridobljenih v kliničnih in predkliničnih študijah izvedenih med letoma 1990 in 2000, so spodbudili Mednarodno združenje za celično terapijo (angl. **International Society for Cellular**

Therapy; ISCT), da je leta 2006 predlagalo enotna merila za opredelitev MSC. Tako morajo biti "multipotentne mezenhimske stromalne celice" sposobne pritrditve na plastiko, izražati CD105, CD73 in CD90 označevalce celične pripadnosti, ne smejo izražati označevalcev CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79 ali CD19 in HLA razreda II, poleg tega morajo biti sposobne diferenciacije *in vitro* v osteoblaste, adipocite in hondrocite (Slika 30).

Čeprav MSC izpolnjujejo te pogoje, sestavljajo heterogeno populacijo celic iz različnih subpopulacij matičnih in predniških celic. Poleg osnovnih označevalcev CD105, CD73 in CD90 ločimo še vrsto drugih molekul, ki se izražajo pri

določenih MSC pod določenimi pogoji
 (Preglednica 3).

Preglednica 3: Najpogostejši označevalci celične pripadnosti mezenhimskih matičnih celic in njihova funkcija.

Označevalec celične pripadnosti	Biološka funkcija
CD29	privzem eksosomov, celična migracija
CD44	homing in adhezija
CD73	protivnetno delovanje
CD90	matičnost
CD105	antagonizacija vezave TGF- β 1 na receptor
CD146	delovanje proti staranju, matičnost
CD166	diferenciacija
CD271	proliferacija in diferenciacija
HLA-A,B,C	odpornost na od NK celic posredovano lizo

2.3.3 Viri mezenhimskih matičnih celic

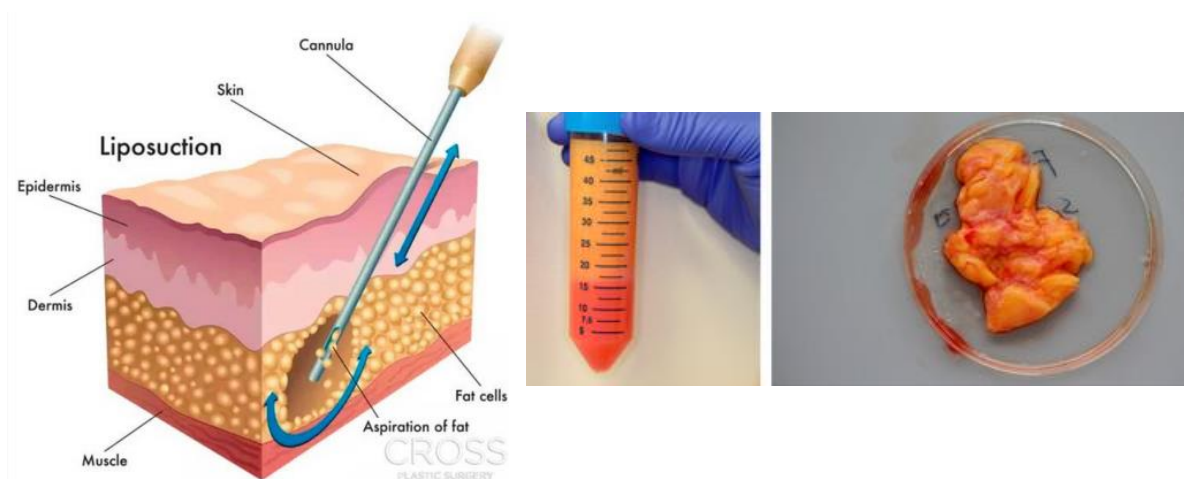
MSC so najprej izolirali iz **kostnega mozga**, kasneje pa iz skoraj vseh telesnih tkiv, kot je **maščobno tkivo, popkovnična kri, Whartonova žolica, amnijska tekočina, nevrosfere, posteljica, zobna pulpa, periferna kri, sinovijska in sinovijalna tekočina, endometrij, kompaktna kost, dermis, otočki trebušne slinavke, možganska tkiva odraslih, tkiva skeletnih mišic, pljuča, srce in lasni mešički**. MSC iz različnih vrst tkiv se med seboj razlikujejo glede na koncentracijo celic, proliferacijske in diferenciacijske sposobnosti ter druge biološke lastnosti in vloge. **Zato je v primeru uporabe za zdravljenje vir MSC za gojenje odvisen od vrste ciljne terapije.** Pred presaditvijo MSC je le-te potrebno izolirati iz tkiva ter jih pomnožiti do ustreznega števila, saj lahko le v zadostni koncentraciji dosežejo željen terapevtski učinek (v tkivu je namreč celic premalo).

Aspiracija kostnega mozga je sicer invaziven postopek, a še vedno pogosto uporabljena metoda pridobivanja MSC, namenjenih za celično terapijo. Kostni mozeg je tudi najbolj raziskan vir MSC. MSC iz kostnega mozga se uporabljajo v ortopediji in kardiologiji za študije zdravljenja akutnega miokardnega infarkta in ishemičnega srčnega popuščanja. Iz 25 mL kostnega mozga lahko v celični kulturi v nekaj tednih proizvedemo 100-150 milijonov MSC.

Pridobivanje MSC **iz maščobnega tkiva** je zanimivo predvsem zaradi relativno **visokega deleža matičnih celic** v tem tkivu. Metode izolacije MSC, pridobljenih iz maščobe, temeljijo na **obdelavi maščobnega tkiva z encimi**, ki delujejo na zunajcelični matriks. Pri tem se celice sprostijo v suspenzijo, od koder jih zberemo s postopkom centrifugiranja. Medtem, ko se odvzem in centrifugiranje štejeta za minimalno roko vanje s celicami v klasifikaciji zdravila za napredno

zdravljenje, se uporaba encimov šteje za večjo manipulacijo. Encimi namreč lahko vplivajo na lastnosti celic, zato tako pridobljene MSC, za razliko od MSC iz

kostnega mozga, uvrščamo med **zdravila za napredno zdravljenje** (glej dalje).



Slika 23: Z liposukcijo pridobimo večje število matičnih celic kot pri izrezani maščobi

Pri izolaciji MSC iz tkiva se lahko uporablja tudi **metoda eksplantacijske kulture**, kjer se tkivo npr. iz Whartonove žolice, kosti ali roženice razreže na manjše koščke in postavi v gojilne posode. Druge metode pridobivanja MSC so **imunomagnetna separacija celic** in **celično sortiranje**, ki se uporabljajo predvsem v raziskovalne namene.

2.3.4 Zdravila za napredno zdravljenje

Napredne oblike zdravljenja in zdravila za napredno zdravljenje (angl. Advanced therapy medicinal product, ATMP) sta izraza, ki se uporabljata za opis inovativnih terapij. Mednarodni regulatorni organi sem prištevajo **zdravila na osnovi genske terapije, somatsko celične terapije in terapije tkivnega inženirstva**. V Sloveniji Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke

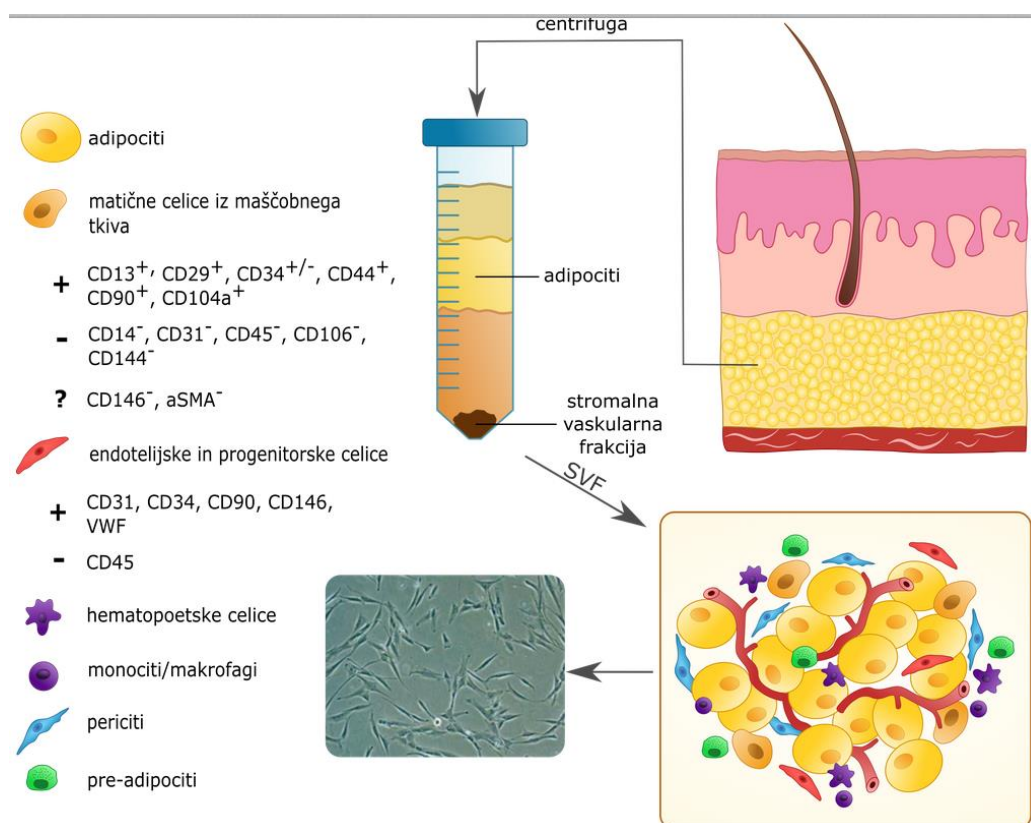
(JAZMP) v postopku pridobitve dovoljenja za promet na podlagi predložene dokumentacije preveri, ali so **za določeno zdravilo dokazani kakovost, varnost in učinkovitost** in ali je **razmerje med tveganjem in koristjo pri uporabi zdravila pozitivno**.

Klasifikacija celic ali celičnega pripravka v zdravilo za napredno zdravljenje je odvisna od načina priprave oziroma stopnje manipulacije in namena uporabe pripravka. Če gre pri pripravi za minimalno rokovanje s celicami, kot je npr. centrifugiranje, čemur sledi vnos v prejemnika, kjer celice opravljajo funkcijo, ki je identična tisti, ki so jo vršile pred odvzemom, potem takega izdelka ne uvrščamo med zdravila za napredno zdravljenje, temveč ga obravnavamo kot človeške celice, namenjene za zdravljenje. V primeru obsežnejše manipulacije, kot so

encimska obdelava tkiva, gojenje celic in aktivacija celic oz. vsi posegi, ki vplivajo na celično biologijo, pa takšen izdelek uvrstimo med ATMP.

Nekateri se uvrstitvi celičnega produkta med ATMP skušajo izogniti. Tako encimsko razgradnjo maščobnega tkiva

nadomeščajo s koncentriranjem lipoaspirata ali z uporabo drugih načinov izolacije matičnih celic. Na splošno ti postopki izolacije še vedno niso tako učinkoviti kot tisti z encimi.



Slika 24: Pridobivanje mezenhimskih matičnih celic iz maščobnega tkiva.

Maščevje je sestavljeno iz dveh glavnih celičnih komponent: iz maščobnih celic (adipocitov) in iz stromalne žilne frakcije (angl. Stromal Vascular Fraction; SVF). S pretočno citometrijo lahko določimo posamezne populacije celic v SVF, ki vsebuje tudi matične celice (angl. Adipose Derived Stem Cells; ADSC). Matične celice najenostavneje izoliramo iz vzorca maščevja po encimski razgradnji tkiva, kateri sledi centrifugiranje in priprava adherentne celične kulture.

2.3.5 Heterogenost mezenhimskih matičnih celic

Heterogenost MSC se odraža na več ravneh (Slika 25). Poleg variabilnosti celic, ki se kaže v **različnih subpopulacijah MSC v samem tkivu, variabilnosti MSC med**

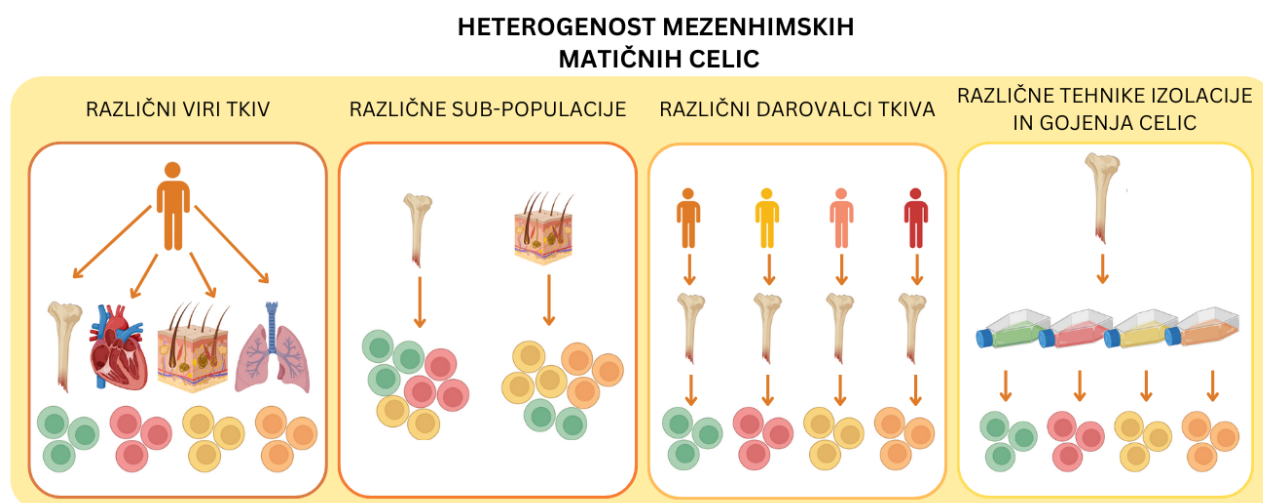
različnimi tkivi in v istem tkivu med različnimi posamezniki, so študije pokazale, da lahko starost, spol in zdravstveno stanje dodatno vplivajo na funkcionalne razlike MSC, ki izhajajo iz istega tkiva. Tako so npr. v raziskavah MSC iz kostnega mozga različno starih

darovalcev dokazali razlike v aktivnosti encima alkalne fosfataze, proliferacijski sposobnosti ter sposobnosti hondrogene, osteogene ali endotelijske diferenciacije.

Ker ima mikrookolje vpliv na celice, je heterogenost prisotna tudi med genetsko enakimi celicami. Dokazali so, da je pomnoževanje in diferenciacija MSC odvisna od vira celic. Študije poročajo tudi o različnih imunomodulatornih lastnostih MSC, pridobljenih iz različnih tkiv. **Na lastnosti gojenih MSC vpliva tudi okolje *ex vivo*. Različne sestavine v gojiščih (serum, kombinacije rastnih dejavnikov)**

in kisik lahko vplivajo na fenotip MSC. Kloni, pridobljeni iz MSC, lahko postanejo heterogeni *in vitro*. Hkrati pa je klonska analiza gojenih MSC pokazala, da se heterogenost že po več pasažah zmanjša na samo nekaj klonov. Zato je potrebno upoštevati, **da se fenotip MSC v tkivu zelo verjetno razlikuje od fenotipa MSC v celični kulturi.**

Z večjim številom pasaž dobimo več MSC za klinično uporabo. Ker pa gojenje lahko vpliva na lastnosti MSC, se za zdravljenje najpogosteje uporablja celice med 3. in 7. pasažo.



Slika 25: Heterogenost mezenhimskih matičnih celic.

Heterogenost MSC se odraža na več ravneh. Njihove različne fenotipske in biološke lastnosti so posledica anatomskih virov tkiv, razlik med darovalci, subpopulacij znotraj tkiva ter tehnik izolacije in gojenja celic.

2.3.6 Celične kulture mezenhimskih matičnih celic

Zaradi visokih odmerkov celic, potrebnih za presaditev ($1-100 \times 10^6$ celic/kg bolnika), je potrebno MSC predhodno pomnožiti v celični kulturi. Koncentracija teh celic v izvornih tkivih je namreč zelo

nizka. Posledica teh spoznanj so bila prizadevanja za razvoj tehnologij za pridobivanje velikega števila celic z ustreznimi terapevtskimi lastnostmi. Poleg tega bi bilo pri alogenski uporabi MSC v bioreaktorskih sistemih možno izdelati

veliko število celic, nato ustvariti celično banko in MSC nato po potrebi odmrzovati.

Celične kulture MSC običajno gojimo v prisotnosti **fetalnega govejega seruma** (FBS). Da bi se izognili tveganju prenosa ksenogenih povzročiteljev bolezni in imunizaciji po presaditvi MSC, se lahko uporabi **človeški serum, plazmo, bogato s trombociti ali lizat trombocitov**. V primerjavi s FBS, lizat trombocitov zmanjša imunske reakcije in poveča proliferacijo MSC. Lizat ima visoko vsebnost fibrinogena, ki spodbuja tvorbo fibrinskih gelov v medijih, ki vsebujejo kalcij, a ta proces lahko preprečimo. Prvo komercialno gojišče brez živalskih sestavin, ki ga je odobrila FDA, je bilo StemPro MSC SFM (Invitrogen).

MSC lahko gojimo na več načinov, in sicer

- i) kot enoslojno celično kulturo,
- ii) v večdelnem gojilnem sistemu,
- iii) v gojilnih posodah v obliki valjev,
- iv) v bioreaktorjih in
- v) v obliki vrečk za statično 3D gojenje (Slika 26-28).

Enoslojna celična kultura ali gojenje v posodi z ravnim dnom, v kateri celice rastejo le v enem sloju ali dvodimenzionalno (2D), je najpogostejši način pomnoževanja MSC predvsem zaradi enostavnosti gojenja in nizkih stroškov. Večdelni sistemi gojenja so zasnovani tako, da povečajo površino za rast celične kulture z uporabo večjega števila gojitvenih enot zloženih eno na drugo. Tako lahko v 10-delnih posodah pripravijo do 3×10^8 celic za presaditev. Za večje

število so potrebne 40-slojne posode z avtomatiziranim manipulatorjem.

Kljub izboljšavam tehnologije gojenja celic v enoslojni kulturi ima ta nekaj slabosti. Pogosto rokovanje s celicami **poveča tveganje za kontaminacijo, vpliv na funkcionalne lastnosti celic zaradi pogostih encimskih obdelav** pri presaditvah celic na večje površine. Statično gojenje vodi do **koncentracijskih gradientov** (pH, raztopljeni kisik, hranila in metaboliti) v gojišču in s tem v heterogeno okolje celic. Sistem ne omogoča nadzor nad parametri gojenja, pri dolgotrajnem pridobivanju večjih količin celic so tu tudi visoki stroški. Poleg tega se gojilne posode za 2D gojenje obravnavajo kot "odprti sistem", saj se rokovanje (inokulacija, izmenjava medijev in zbiranje celic) izvaja v laminarnih pretočnih komorah. Čeprav bi avtomatizacija lahko zmanjšala zgoraj navedene pomanjkljivosti, ta tehnologija še vedno ni primerna za pridobivanje zelo velikega števila MSC.

Druga možnost je **uporaba gojilnih posod v obliki valjev**. Sistem sestavlja več valjastih posod, nameščenih v vrtečo se napravo. Celična kultura raste tako, da tvori enojni sloj na notranji površini valja, gojilni medij pa se neprekinjeno premika preko celic. Sistem, ki še vedno predstavlja odprt sistem, ponuja večjo površino za rast, vendar se v rutinski uporabi ni obnesel.

Visoka stopnja proizvodnje celic (vsaj 1×10^6 celic/kg telesne teže odraslega pacienta) v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP) in standardi kakovosti

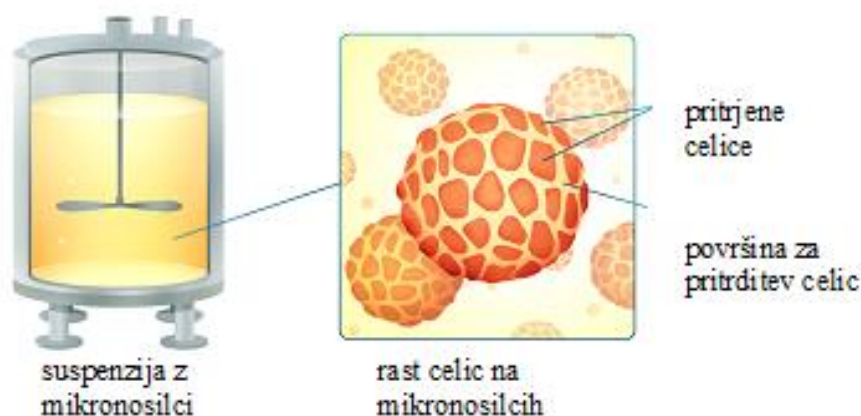
zahteva **popolnoma zaprt, nadzorovan sistem gojenja**. Te zahteve izpolnjuje bioreaktor, ki ga v osnovi definiramo kot sistem z ustreznim nadzorom pH, temperature, koncentracije kisika in ogljikovega dioksida, za zagotavljanje homogenega fizikalno-kemijskega okolja za celice.

Za gojenje MSC v zaprtem sistemu je bilo uporabljenih že več vrst bioreaktorjev. Na splošno velja, da mora biti bioreaktor enostaven za uporabo, omogočati mora natančno spremljanje parametrov ter dosegati visoke koncentracije celic. Prav tako mora omogočati enostavno zbiranje celic in biti ekonomsko učinkovit. Na voljo so konfiguracije za enkratno uporabo do 2000 litrov, ki jih ni potrebno čistiti in sterilizirati. Tehnologije za enkratno uporabo so v industrijski proizvodnji celičnih terapevtskih pripravkov pogoste.

Ti bioreaktorji imajo vgrajena mešala različnih oblik in velikosti, ki se vrtijo okoli svojih osi in s tem mešajo vsebino v posodi (Slika 26). Homogenost gojilnega medija tako omogoča homogenost celične kulture.

MSC se začnejo pomnoževati *in vitro* šele po pritrditvi na ustrezno podlago, zato v primeru, da MSC niso pritrjene na dno ali stene posode, potrebujejo neko drugo obliko nosilnega materiala. Za gojenje MSC v bioreaktorjih uporabljajo npr. **mikronosilce - majhne kroglice, premera 100 - 300 μm** . Mikronosilci zagotavljajo veliko površino za pritrditev celic glede na volumen: 30 cm^2/cm^3 medija za mikro nosilca Cytodex-3, glede na 2D gojilne posode s 3 cm^2/cm^3 medija, kar omogoča doseganje precej višjega donosa celic, s časovno in stroškovno varčno proizvodnjo. Mikronosilci so običajno kroglice z različnimi gostotami, premeri in površinskimi naboji. Različnim celicam namreč ustrezajo različni mikronosilci.

Bioreaktor z mešali



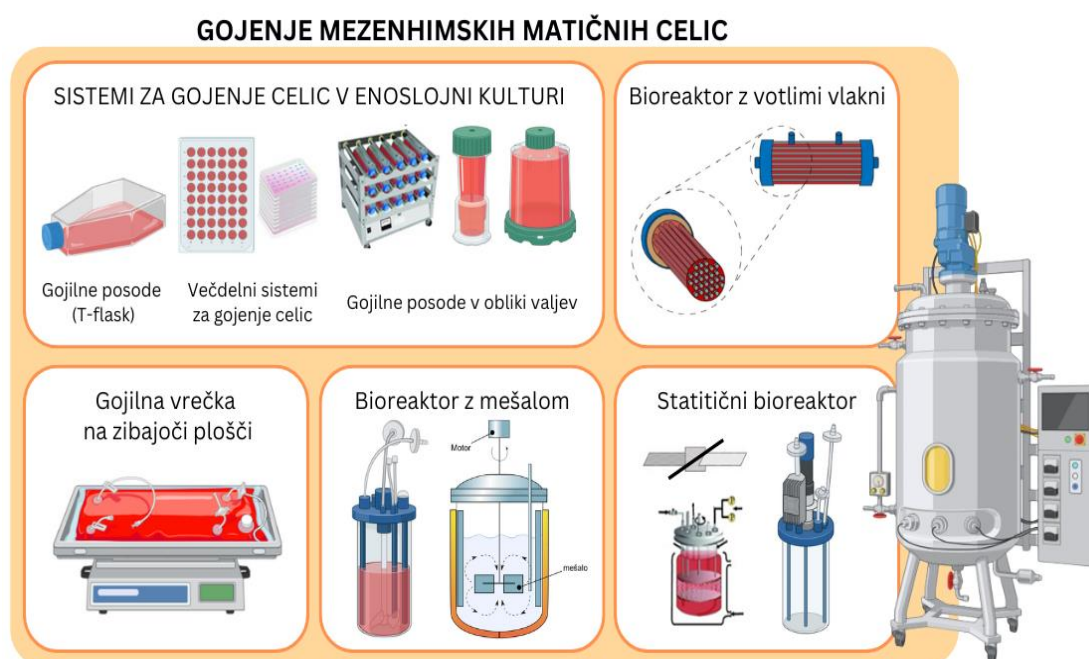
Slika 26: Bioreaktor z mešalom za pomnoževanje mezenhimskih matičnih celic.

Da bi se MSC pričele pomnoževati, se morajo predhodno pritrditi na podlago. V primeru gojenja v bioreaktorju je ta podlaga lahko v obliki mikrokroglic – mikronosilcev.

Mikronosilce preraščene s celicami lahko obdelamo s proteolitičnimi encimi, ki razcepijo kovalentne vezi, ki so nastale med površino nosilca in integrini na celični površini. Celice od mikronosilcev ločimo s filtriranjem.

Nihajni bioreaktor

Bioreaktor je sestavljen iz plastične vrečke za enkratno uporabo, nameščene na plošči, ki z zibanjem povzroči gibanje tekočine v vrečki, kar zagotavlja porazdelitev hranil in kisika ob zmerni strižni napetosti. Prav tako predstavljajo ti reaktorji minimalno tveganje za kontaminacijo (zaprt sistem), potrebni pa so mikronosilci za MSC (Slika 28).



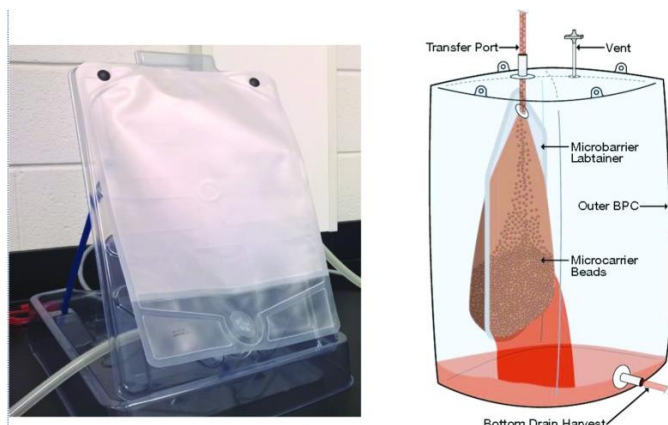
Slika 27: Gojenje mezenhimskih matičnih celic v 2D in 3D celičnih kulturah.

Bioreaktor z votlimi vlakni

V osnovi je tak bioreaktor sestavljen iz poroznih votlih vlaken, ki so vstavljena v valj, napolnjen z gojilnim medijem, ki vstopa in izstopa iz valja. Celice se inokulirajo v notranjosti vlaken, hranila iz gojilnega medija difundirajo skozi pore vlaken v notranjost vlaken do celic (Slika 27).

Bioreaktor za statično gojenje

Bioreaktor vsebuje predel s fiksnim nosilcem za celice, kjer se celice inokulirajo. Čeprav ta bioreaktor omogoča 3D gojenje celic in s tem boljše posnemanje pogojev *in vivo*, lahko pride do gradientov koncentracije hranil, metabolitov, celic.



Slika 28: Gojenje mezenhimskih matičnih celic v gojilnih vrečkah za enkratno uporabo, v statičnih pogojih na mikronosilcih (Thermo Scientific).

2.3.7 Analize mezenhimskih matičnih celic

Kot pri ostalih matičnih celicah tudi za MSC velja, da jih **ne moremo identificirati zgolj po morfoloških lastnostih**. Najpogosteje jih fenotipiziramo, poznamo pa tudi funkcijske teste (diferenciacijske in imunomodulatorne). Nekaterne metode so zbrane v Preglednici 4.

2.3.7.1 Fenotipske analize

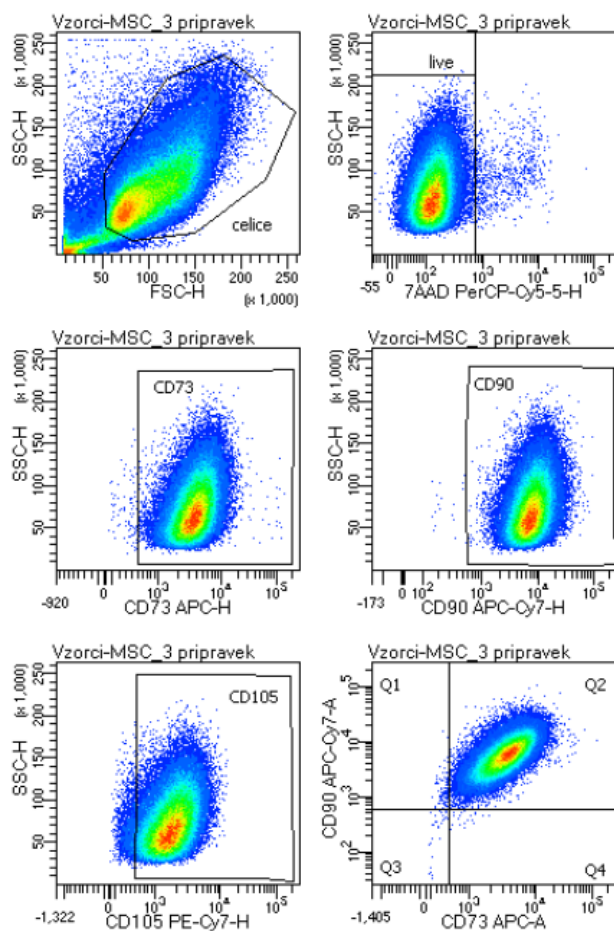
MSC, pridobljene iz različnih tkiv oz. anatomskih lokacij, imajo lahko različen razvojni izvor ter različne lastnosti in funkcije, kar lahko oteži njihovo identifikacijo. Za analize MSC se uporabljajo različne metode, običajno jih identificiramo s fenotipizacijo (Slika 29, 30). Njihova identifikacija temelji na prisotnosti nekaterih specifičnih površinskih označevalcev in hkrati na

odsotnosti drugih. Poleg osnovnih označevalcev celične pripadnosti, ki jih ISCT priporoča kot dokaz MSC, so odkrili še več kot 30 površinskih molekul, ki se lahko izražajo na MSC.

Identifikacija MSC je nujna, ko želimo določiti koncentracijo izoliranih celic (redkeje gojenih celic, saj so v celični kulturi vse celice MSC). **Koncentracija MSC se med tkivi razlikuje, vendar je za vsa tkiva značilna razmeroma nizka koncentracija matičnih celic.** Na število MSC v tkivu vplivajo številni dejavniki. Koncentracija MSC v kostnem mozgu je npr. odvisna od bolnikove starosti, uporabljenih zdravil, zdravstvenega stanja in bolezni kostnega mozga. Znanstveniki menijo, da se število MSC s starostjo zmanjšuje, kar bi lahko bil razlog za manjšanje sposobnosti MSC za regeneracijo tkiva z leti.

Preglednica 4: Laboratorijski postopki za določanje števila in lastnosti mezenhimskih matičnih celic

Laboratorijski postopek	Najpogostejša izvedba
Določitev koncentracije MSC v izvornem tkivu	pretočna citometrija (CD73, CD90, CD105, CD271, fluorescenčne kroglice za štetje; slika 11); posredno s CFU-F testom
Klonogenost MSC v izvornem tkivu	CFU-F test
Morfologija celic enoslojni celični kulturi	svetlobna mikroskopija
Proliferacija celic in celični cikel	CFU-F test; pretočna citometrija (označevanje celic s CFSE, anti-BrDU, 7-AAD)
Viabilnost in apoptotičnost celic	pretočna citometrija (7-AAD, aneksin V, membranski potencial mitohondrijev)
Senescenca MSC	svetlobna mikroskopija (encim β -galaktozidaza razgrajuje dodani kromogen substrat X-gal)
Fenotipizacija MSC	fluorescenčna mikroskopija; pretočna citometrija (določitev specifičnih označevalcev celične pripadnosti, glej Tabelo 1,2); RT-qPCR (mRNA)
Določitev sposobnosti linijske diferenciacije	celična kultura (osteogena, adipogena in hondrogena diferenciacija)
Določanje sproščenih bioaktivnih molekul	pretočna citometrija; kemoluminiscenca (specifični rastni dejavniki, citokini, nukleinske kisline)
Imunomodulacijske sposobnosti MSC	pretočna citometrija; kemoluminiscenca (funkcijski testi)
Določitev dolžine telomer, določitev aktivnosti telomerase, določitev stopnje metiliranosti genov, epigenetika, kariotipizacija	različni molekularno-biološki postopki



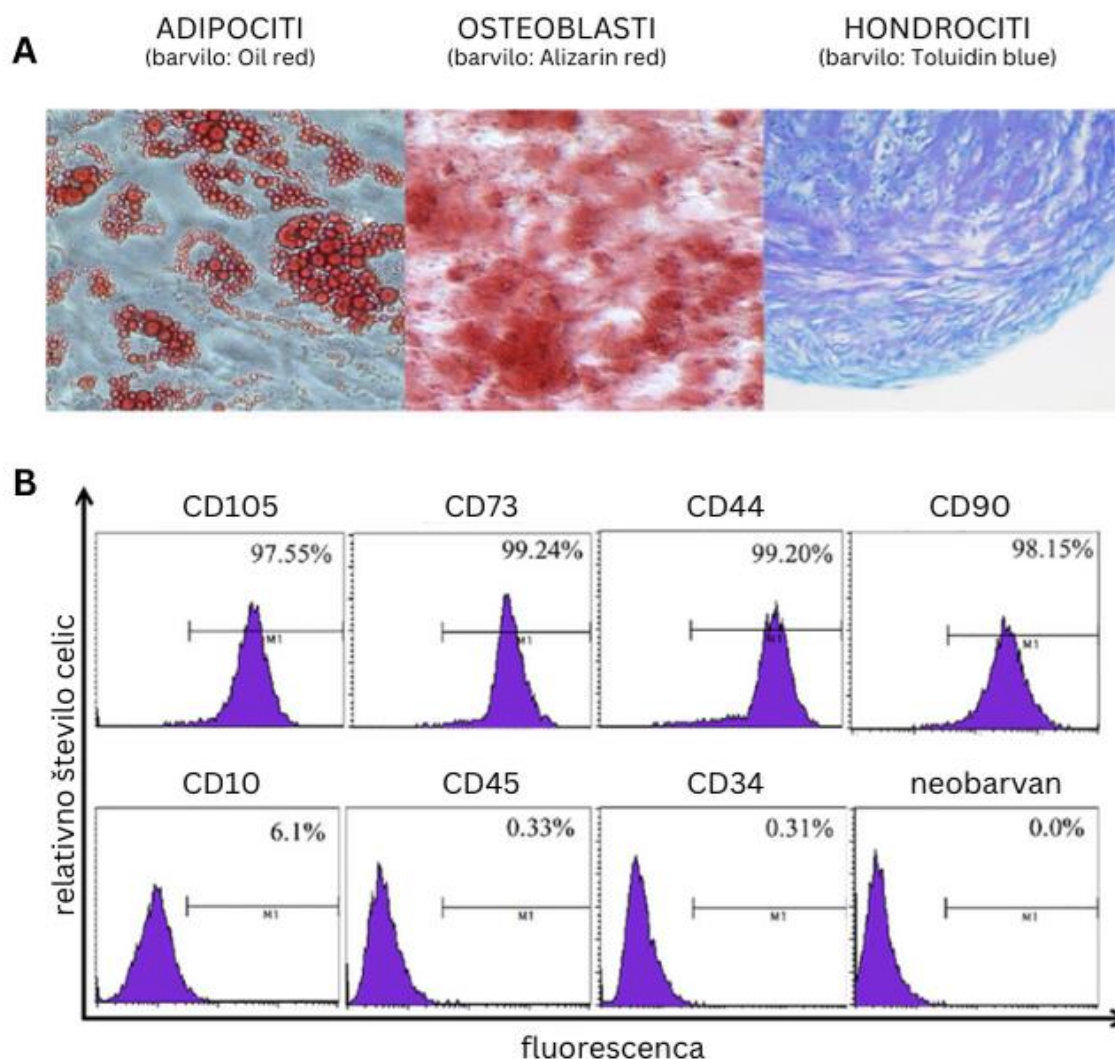
Slika 29: Primer fenotipske analize mezenhimskih matičnih celic s pretočnim citometrom.

V celični kulturi so predhodno pomnožene mezenhimske matične celice obarvane z barvilom za viabilnost (7-AAD, ki prehaja v mrtve celice in se veže na DNA), ter s protitelesi anti-CD73, anti-CD90 in anti-105.

2.3.7.2 Funkcijske analize

S funkcijskim testom v celični kulturi dokažemo, da so MSC sposobne pomnoževanja, diferenciacije ali vpliva na druge celice (npr. imunomodulacije). Diferenciacije v adipocite, osteoblaste in hondroците je prikazana na Sliki 30. Matične celice najprej pomnožimo, nato z dodatkom gojišča, ki omogoča želeno diferenciacijo, usmerimo razvoj celic do zrelih celic. Diferenciacijo celic v

adipogeno linijo tako spodbuja visoka koncentracija glukoze, dodatek deksametazona, inzulina, indometacina in 3-isobutil-1-metilksantina, za optimalno diferenciacijo v osteogeno linijo pa uporabljajo deksametazon, β -glicerofosfat in askorbinsko kislino. Tip diferenciranih celic dokažemo z barvili, ki obarvajo sestavino, ki je specifična za določen tip diferenciranih celic.



Slika 30: Funkcijski test za potrditev sposobnosti diferenciacije celic.

A) Celične kulture adipocitov, osteoblastov in hondrocitov, diferenciranih *in vitro* iz mezenhimskih matičnih celic. B) Fenotipska analiza mezenhimskih matičnih celic in kontrolnih celic s pretočno citometrijo.

2.3.8 Uporaba mezenhimskih matičnih celic za zdravljenje

Potencial MSC za zdravljenje različnih bolezni kot so **ortopedske, nevrodegenerativne motnje, pljučne bolezni, endokrinološke bolezni, bolezni kože in vezivnega tkiva, bolezni srca in ožilja** in drugo, je velik, kar potrjuje vse več registriranih kliničnih študij z uporabo MSC (Slika 20). Obetavno področje, ki

omogoča razvoj novih terapevtskih pristopov so tudi **genske modifikacije** mezenhimskih matičnih celic, ki vključujejo vnos ali izločanje specifičnih genov z namenom izboljšanja njihovih terapevtskih lastnosti. Na primer, z vnosom genov, ki kodirajo rastne dejavnike ali citokine. Ta postopek se izvaja z različnimi metodami, kot so virusni vektorji, CRISPR/Cas9, TALEN in ZFN tehnologije. Genske modifikacije MSC uporabljajo za povečanje njihove

imunosupresivne funkcije, kar je koristno pri zdravljenju avtoimunskih bolezni in preprečevanju zavrnitve presadka. Modificirane MSC lahko izražajo protivnetne molekule, ki zmanjšujejo imunski odziv in preprečujejo vnetje. To je še posebej pomembno pri boleznih, kot so revmatoidni artritis, multipla skleroza in Crohnova bolezen.

2.3.8.1 Kontrola kakovosti celičnega pripravka MSC za zdravljenje

Pripravek na osnovi gojenih MSC se obravnava kot zdravilo za napredno zdravljenje (advanced therapy medicinal products, **ATMP**) in mora biti izdelan v skladu z dobro proizvodno prakso (Good Manufacturing Practices, **GMP**). Trenutno priprava in uporaba MSC v praksi večinoma poteka tako, da vsak raziskovalni center odda vlogo za odobritev zdravljenja za vsak primer posebej svojemu lokalnemu regulatornemu organu (JAZMP).

Laboratorijski testi za oceno kakovosti MSC se opravljajo **med celično proizvodnjo in ob pripravi končnega celičnega pripravka za klinično uporabo**. Vključujejo lahko **oceno morfoloških lastnosti, živost, značilnost rasti celic, kariotip, fenotipske in funkcijske lastnosti aseptičost, apirogenost, itd.** V Preglednici 4 so zbrani različni laboratorijski postopki, ki jih lahko uporabimo za določanje kakovosti MSC. Ne glede na to, ali se MSC za zdravljenje uporabijo po gojenju ali takoj po pridobitvi iz tkiva, se začetno število izoliranih MSC ne določa. Najverjetnejši razlog za to je, da je število MSC v tkivih majhno. Poleg nizkega števila,

je drugi razlog, da se števila celic ne določa tudi fenotipska kompleksnost MSC (Slika 25). Poleg tega se MSC razlikujejo tudi glede na izvor.

Čeprav med državami še ni soglasja o standardih za nadzor kakovosti celičnega produkta, naj bi se upoštevala tri minimalna merila, ki jih je predlagal ISCT za dokaz MSC: i) pritrditev MSC na plastiko, ii) izražanje specifičnih površinskih antigenov in iii) sposobnost diferenciacije *in vitro*. Ustrezen fenotipski profil viabilnih (živih) MSC, ki se določa s pretočnim citometrom, je ključen za sprostitvev končnega pripravka v uporabo. Viabilnost pomnoženih MSC v pripravku za presaditev naj bi bila nad 90% (Slika 29, 30).

2.3.8.2 Omejitve pri uporabi za zdravljenje

Dosedanje klinične študije so pokazale, da je presaditev MSC izvedljiv in varen postopek, tako pri uporabi celic za obnovo tkiv, kot tudi za ublažitev poteka različnih bolezni z imunomodulacijo. Glede terapevtske učinkovitost MSC, pa obstajajo nekateri pomisleki, saj so rezultati kliničnih raziskav precej variabilni. Študije je med seboj težko primerjati, pri čemer je razlogov več: od **pomanjkanja standardov za pripravo celičnih pripravkov in njihove kontrole kakovosti, do različnega načina aplikacije in odmerkov MSC, predvsem pa je potreben dogovor o načinu spremljanja učinkovitosti zdravljenja**. Medtem, ko so postopki za pridobivanje **velikega števila** MSC že vpeljani, je poleg tega potrebno izboljšati še specifično funkcionalnost celic. V zadnjih letih so tako npr. številne

študije pokazale, da morajo biti MSC stimulirane z vnetnimi citokini oziroma drugimi imunskimi mediatorji, preden lahko vplivajo na imunske celice v vnetem ali poškodovanem tkivu.

MSC uporabljene za zdravljenje bi lahko sprožile tudi neželene učinke, kot so:

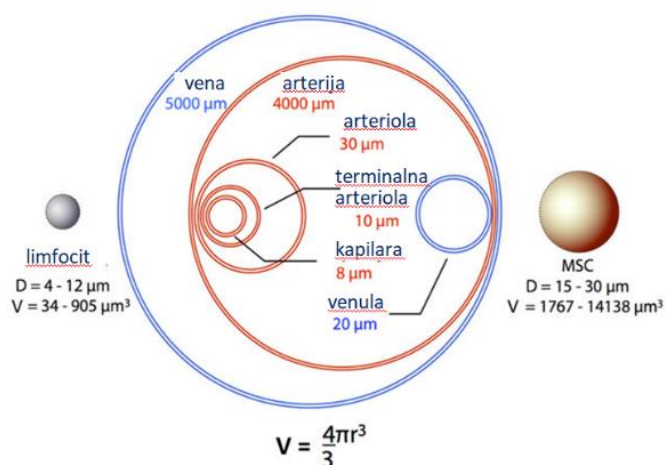
- **neželen imunski odziv**
- **pro-tumorigeno delovanje**
- **diferenciacijo MSC v neustrezno tkivo**
- **kopičenje v kapilarah**

Zapleti pri terapijah z MSC so lahko povezani z njihovimi imunosupresivnimi lastnostmi, ki lahko dolgoročno **zmanjšajo imunski odziv prejemnika** ob okužbah s patogeni. Zaradi občutljivosti MSC na spremembe v mikrookolju prav tako obstaja tveganje, da v času kroničnih vnetij **spremenijo svoj fenotip**. Stresni pogoji v kulturi bi lahko povzročili **sponatno diferencirajo MSC** ali tvorbo potencialno tumorigenih celic. Nekatere študije so tudi pokazale, da lahko MSC z vplivom na imunski sistem povzročijo, da le-ta postane manj uspešen v boju proti rakavim celicam. Dokazali so tudi, da lahko MSC povečajo izražanje dejavnikov angiogeneze, kot sta TGF β in IL6, ki **povzročata rast krvnih žil**. S tem se poveča oskrba s kisikom in hranili ter posledično rast tumorjev.

Potrebno je tudi izboljšati postopek vnosa celic v telo in migracijo MSC na želeno mesto. Najpogostejši načini aplikacije MSC so intravenska ali intraarterijska infuzija ali direktna injekcija celic v tkivo bolnika. Za intravensko infuzijo je bilo dokazano, da se z uporabo te metode zmanjša sposobnost migracije MSC na zelena mesta (homing), torej sposobnost potovanja izven niš matičnih celic do mest, kjer je nastala poškodba.

Poleg tega je bilo v mnogih primerih ugotovljeno, da je zadrževanje MSC na mestu poškodbe časovno omejeno. Tako naj bi se manj kot 1% presajenih MSC dolgoročno zadržalo v ciljnem tkivu.

Težava pri zdravljenju z MSC je lahko tudi njihova velikost, saj so **MSC razmeroma velike celice. Ko jih osamimo iz tkiva so sferične oblike, po pritrditvi na podlago v gojilni posodi pa pridobijo fibroblastno obliko in s časom v celični kulturi postajajo vse večje**. Medtem ko so MSC so v nativnem tkivu velike 15-30 μ m, v *in vitro* pogojih postajajo do 100 μ m velike. Velikost presajenih MSC pa lahko predstavlja težavo pri njihovem gibanju po telesu (Slika 31).



Slika 31: Mehanske ovire med potovanjem mezenhimskih matičnih celic (MSC) po telesu.

Velikost MSC, še posebej tistih, dlje časa gojenih *ex vivo*, ovira njihovo potovanje preko manjših žil krvožilnega sistema. To omejuje dostop MSC do različnih tkiv, vključno s tumorji. Kratice: D, diameter; MSC, mezenhimske matične celice; V, volumen.

Potencialni neželeni učinki presajenih MSC so privedli do razmišljanja o uporabi **brezceličnih pripravkov z bioaktivnimi molekulami, ki jih proizvajajo MSC.**

2.7.8 Bioaktivne molekule mezenhimskih matičnih celic

V začetkih uporabe MSC za zdravljenje je prevladovalo mnenje, da je obnova tkiv posledica diferenciacije presajenih celic v specializirane celice, ki zamenjajo mrtve in poškodovane celice. Vendar obstaja vedno

več dokazov, da so opaženi terapevtski učinki posledica delovanja bioaktivnih molekul, ki jih izločajo MSC (Slika 32). Rastni dejavniki, citokini in druge molekule, ki jih imenujemo »**sekretom MSC**«, najverjetneje vplivajo na endogene mehanizme za popraviljanje škode v tkivih. Predlagali so celo, da bi se MSC zdaj imenovala medicinske signalne celice, kar natančneje odraža njihov način delovanja.

Preglednica 5: Bioaktivne molekule mezenhimskih matičnih celic in njihovi imunomodulatorni učinki

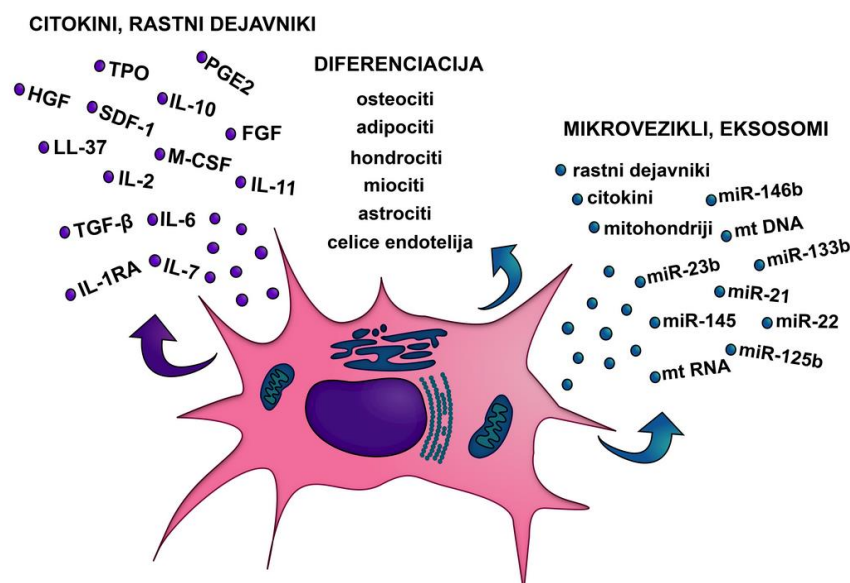
MOLEKULA	IMUNOMODULAT. DEJAVNIK	VLOGA PRI IMUNOMODULACIJI	SPROŠČENE MOLEKULE
encim	iNOS	Inhibira proliferacijo celic T	
	HO-1	Inhibira T celični odgovor, inducira nastajanje celic Tr1 in Treg	
	IDO	Inhibira proliferacijo celic T, vzpodbuja diferenciacijo makrofagov v M2 makrofage, zmanjšuje aktivnost celic NK	
kemokin	CCL2	Inhibira proliferacijo in aktivacijo CD4+ celic Th17, vzpodbuja migracijo monocitov	
interlevkin	TSG6	Regulira makrofage, zavira vnetje	

	IL-6	Inhibira diferenciacijo dendritičnih celic, inhibira proliferacijo celic T	
	TGF β	Inducira nastanek celic Treg, inhibira aktivacijo celic NK	
	IL-10	Inhibira T celični odgovor, zavira Th17 celično diferenciacijo	
hormon	PGE2	Inhibira funkcijo celic NK, inducira nastanek M2 makrofagov, inhibira dozorevanje DC celic	
ostalo	Semaphorin-3A	Inhibira proliferacijo celic T	
družina molekul B7	B7-H4	Inhibira aktivacijo in proliferacijo celic T	MEMBRANSKO VEZANE MOLEKULE
	B7-H1 / PDL1	Inhibira proliferacijo celic Th17 in T	
	B7-DC / PDL2	Inhibira proliferacijo celic T in Th17	
adhezijske molekule	ICAM-1 IN VCAM-1	Več, kot ju MMC izražajo, večjo sposobnost zaviranja imunskega sistema imajo	
družina TNF	FasL	Inducira T celično apoptozo	

Sekretom MSC vsebuje številne celične signalne molekule, ki vplivajo na vedenje celic, npr. na **proliferacijo, diferenciacijo in proizvodnjo izvenceličnega matriksa, poleg tega pa imajo te molekule tudi imunomodulatorne učinke**. Lahko proizvajajo imunosupresivne dejavnike, kot so **IDO (indoleamin-2,3-dioksigenaza)**, **NO (dušikov oksid)**, **IL-10**, **TGF- β (transformirajoči rastni faktor β)**, **CCL2 (kemokinski ligand 2)**, **PGE2 (prostaglandin E2)**, **IL-1Ra (antagonist receptorjev IL-1)**, **M-CSF (makrofagni kolonije stimulirajoči faktor)** (Preglednica 5). Druge pomembne biomolekule, ki jih izločajo MSC, so še **HGF (dejavnik rasti hepatocitov)**, ki naj bi deloval imunomodulatorno in antiapoptotično, vplival na migracijo, razvoj celic ter celjenje ran; **TGF- β (transformirajoči rastni dejavnik β)**, ki deluje pri imunomodulaciji, rasti celic, proliferaciji in

diferenciaciji ter celjenju ran; **VEGF (vaskularni endotelijski rastni dejavnik)**, ki igra veliko vlogo pri angiogenezi, a tudi pri imunomodulaciji in celičnem preživetju, s **TNF stimuliran protein TSG-6 (s TNF stimuliran protein 6)**, **galektin 1 in 9**, za katera je bilo ugotovljeno, da igrata pomembno vlogo pri imunomodulaciji.

V različnih kliničnih študijah so proučevali učinek **posameznih biomolekul**. Injekcija VEGF je bila tako sicer učinkovita pri izboljšanju angiogeneze pri bolnikih s koronarno boleznijo srca, vendar v vseh izvedenih študijah niso uspeli doseči terapevtske učinkovitosti MSC. Uporabljeni so bili tudi veliki odmerki IL-2 za zdravljenje metastatskega melanoma in karcinoma ledvičnih celic, vendar so bili odzivi nizki.



Slika 32: Multifunkcionalnost mezenhimskih matičnih celic.

Poleg izkazovanja diferenciacijskih sposobnosti, MSC na različne načine vplivajo na druge MSC in druge vrste celic

Med gojenjem v celični kulturi lahko proizvedene molekule MSC pridobimo iz ponovno uporabljenega gojilnega medija. Izraz »obogateno gojišče« ali »conditioned medium« se uporablja za ponovno uporabljen medij ali kombinacijo svežega medija in ponovno uporabljenega medija iz predhodnih celičnih kultur. Obogateno in brezcelično gojišče pripravimo s centrifugiranjem iztrošenega gojišča, s čimer odstranimo celične ostanke, nato pa ga v koncentrirani ali frakcionirani obliki lahko dodamo v svež gojilni medij. S frakcioniranjem obogatenega gojišča lahko povežemo določene molekule s specifičnim učinkom in vitro.

Pogoji celičnega gojenja vplivajo na sestavo sekretoma MSC. Zato bi bilo pogoje smiselno natančno definirati za pridobivanje specifičnega produkta namenjenega zdravljenju.

Dobro definiran gojilni medij je ključnega pomena za pridobivanje zelenih pripravkov MSC. Za karakterizacijo in analizo sekretoma je namreč potrebno **ločiti med sestavinami, ki so že vsebovane v mediju in tistimi, ki so jih proizvedle celice.** V večini raziskav z MSC uporabljajo fetalni goveji serum (FBS) zaradi razmeroma nizke ravni protiteles in velikih količin rastnih dejavnikov. Vendar je sestava FBS lahko variabilna, odvisno od tega, kje, kdaj in kako je bil serum zbran. **Serum vsebuje tudi lastne eksosome, ki jih je potrebno najprej odstraniti.** Nadomestki za FBS so človeški serum (avtologno zdravljenje s celicami), lizat človeških trombocitov ali uporaba različnih kemično definiranih brezserumskih medijev.

Na sekretom MSC vplivajo tudi starost, spol in bolezensko stanje darovalca, zato je razumevanje vpliva teh dejavnikov

ključnega pomena za razvoj in uporabo pripravkov, pridobljenih iz MSC. Razlikujejo se tudi sekretomi MSC, izolirani iz različnih virov. Ena od raziskav je pokazala tudi, da MSC izolirane iz Whartonove žolice izločajo večje količine citokinov, provnetnih beljakovin in rastnih dejavnikov, medtem ko imajo tiste, pridobljene iz maščobnega tkiva, povečan angiogeni profil ter izločajo večje količine izvenceličnih proteinov in metaloproteinaz. Obogateno gojišče celičnih kultur MSC so uporabili za zdravljenje kožnih ran, osteogenezo in poškodbo ledvic.

Kljub široki paleti bioaktivnih molekul, ki jih sproščajo MSC, pa je učinek teh molekul omejen z njihovo stabilnostjo. V fizioloških pogojih lahko namreč funkcionalna stabilnost citokinov in rastnih dejavnikov izzveni že v nekaj minutah. Na srečo je veliko bioaktivnih molekul mogoče najti tudi **v zunajceličnih veziklih**.

2.4 ZUNAJCELIČNI VEZIKLI

Zunajcelični vezikli sestavljajo heterogeno populacijo **mešičkov, ki jih obdaja fosolipidni dvosloj**. Odkrili so jih v različnih telesnih tekočinah, kot kri, slina, materino mleko, cerebrospinalna tekočina in urin. Raziskave so pokazale, da tudi MSC izločajo vezikle, ki vsebujejo številne biomolekule, med katerimi so poleg rastnih dejavnikov in citokinov tudi različne oblike RNA. Tako so zunajcelični vezikli zbrani iz celične kulture MSC trenutno najbolj obetavni proizvodi MSC primerni za zdravljenje. Uporaba

zunajceličnih veziklov, pridobljenih iz MSC, ima nekaj prednosti pred uporabo celic. Prvič, njihova aplikacija **preprečuje vnos celic s spremenjeno ali poškodovano DNK**. Drugič, vezikli **so majhni in zlahka krožijo po telesu**, medtem ko so MSC velike in težko prehajajo skozi kapilare (Slika 31). Tretjič, število presajenih MSC se po presaditvi hitro zmanjša, zato bi bilo **delovanje veziklov pridobljenih iz MSC dolgotrajnejše**. In nazadnje, ker v tem primeru nimamo več opravka z živimi celicami, sta shranjevanje in transport bistveno enostavnejša in zato povezana z nižjimi stroški.

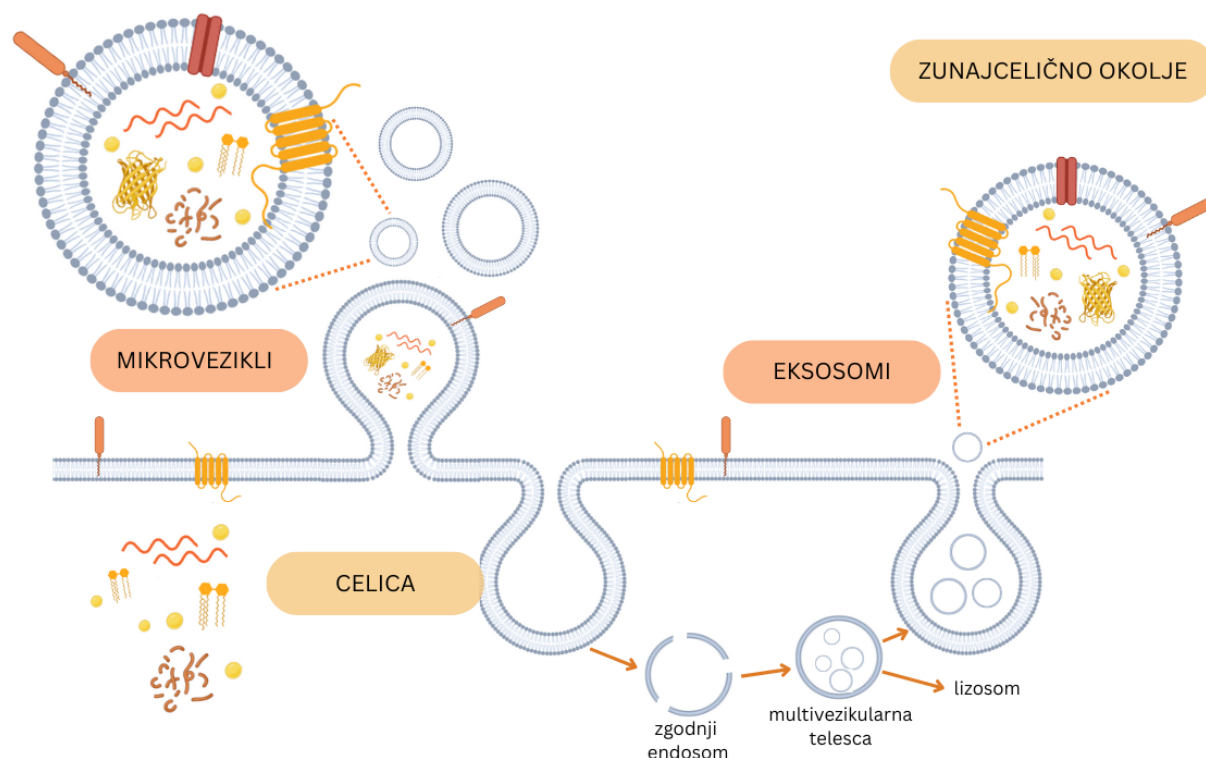
Čeprav je uporaba zunajceličnih veziklov za zdravljenje v bodočnosti zelo verjetna, čaka raziskovalce na tem področju še veliko izzivov. Trenutna velika pomanjkljivost uporabe veziklov je pomanjkanje postopkov za **določitev njihovega terapevtskega potenciala**. Vsebina veziklov je odvisna od vrste tkiva, iz katerega so bile izolirane MSC, obstaja tudi razlika med darovalci, pomemben vpliv pa imajo tudi pogoji celičnega gojenja. Medtem, ko je bilo opravljenih veliko raziskav v zvezi z odzivom MSC na okoljske dejavnike, kot so oksigenacija, mehanske sile in kemični dražljaji, vemo bistveno manj o učinkih teh dejavnikov na sestavo sekretoma in zunajceličnih veziklov.

2.4.1 Vrste zunajceličnih veziklov in njihov nastanek

Zunajcelični vezikli prenašajo različne vrste bioaktivnih molekul, med katerimi so **proteini (celični površinski receptorji, signalni proteini, transkripcijski faktorji,**

encimi, proteini zunajceličnega matriksa) ter nukleinske kisline (mRNA, miRNA, DNA). Te molekule se s pomočjo veziklov prenašajo do tarčnih celic, kjer sprožijo aktivacijo različnih signalnih poti in

vplivajo na delovanje ali usodo celic. Zunajcelični vezikli imajo tako **pomembno vlogo v medcelični komunikaciji ter sodelujejo pri številnih fizioloških in patoloških procesih** (Slika 33).



Slika 33: Nastanek eksosomov in mikroveziklov.

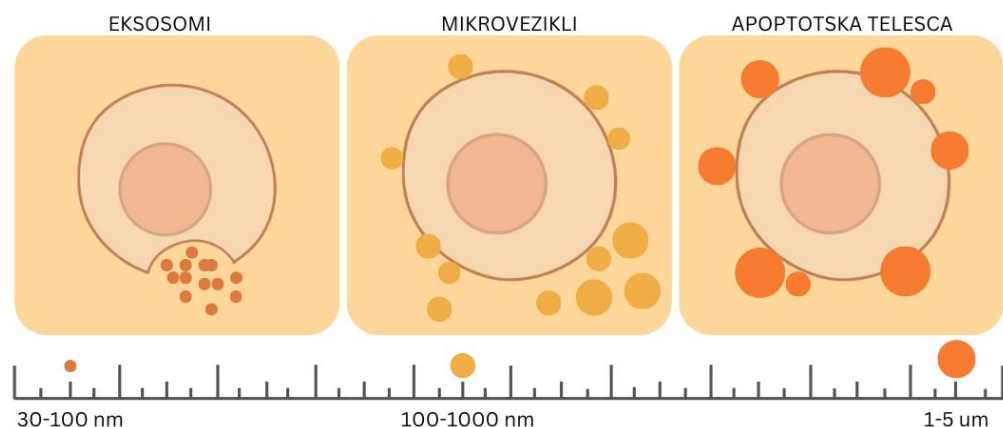
Biogeneza eksosomov se začne s formiranjem zgodnjih endosomov, ki nastanejo z endocitozo plazemske membrane. Iz zgodnjih endosomov nastanejo pozni endosomi, ki dozori v multivezikularna telesca (MVB), ki vsebujejo eksosome. Slednji se z eksocitozo sprostijo v medcelični prostor. Lahko pa se MVB zlijejo z lizosomi, kjer sledi njihova razgradnja. Mikrovezikli nastanejo z brstenjem citoplazemske membrane.

Glede na velikost in znotrajcelični izvor delimo zunajcelične vezikle na **eksosome, mikrovezikle (imenovani tudi ektosomi) in apoptotska telesca** (Slika 33, 34, Preglednica 6). **Apoptotska telesca se iz plazemske membrane celic sprostijo ob celični smrti in za terapevtske namene niso uporabna.**

Eksosomi nastajajo znotrajcelično z brstenjem endosomske celične membrane navznoter, kar povzroči da se eksosomi nabirajo znotraj endosoma. Tako nastane multivezikularno telesce, ki se zlije z membrano celice in tako sprosti eksosome v medcelični prostor (Slika 33). Lahko pa se tudi zlije z lizosomi, kar sproži razgradnjo eksosomov.

Mikrovezikli so podobne velikosti kot bakterije. Nastajajo neprekinjeno, z nagubanjem in reorganizacijo citoskeleta in nato odcepom dela celične membrane v zunajcelični prostor. Izločanje mikroveziklov je uravnava s pomočjo

površinskih receptorjev in povečano koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Izločanje veziklov se občutno poveča, kadar so prisotni še dodatni dražljaji kot so okužbe, ishemije in radiacija.



Slika 34: Vrste zunajceličnih veziklov: eksosomi, mikrovezikli in apoptotska telesca.

Preglednica 6: Glavne značilnosti eksosomov, mikroveziklov in apoptotičnih telesc.

	EKSOSOMI	MIKROVEZIKLI	APOPTOTSKA TELESKA
Velikost	30-100 nm	100-1000 nm	1-5 μm
Poreklo	intraluminalni vezikli v multivezikularnih telescih	celična membrana in vsebina celice	celična membrana in celularni fragmenti
Mehanizem nastanka	fuzija multivezikularnih telesc s celično membrano	nastanejo z brstenjem iz celične membrane	programirana celična smrt
Čas sproščanja	10 minut ali več	nekaj sekund	-
Sestava lipidne membrane vezikla	bogata z ceramidi, izpostavljeni fosfatidilserini, vsebuje lipidne rafte	bogata s holesterolom in diacilglicerolom, vsebuje lipidne rafte	-
Vsebina vezikla	proteini, mRNA, miRNA, lipidi	proteini, mRNA, miRNA, lipidi	proteini, mRNA, miRNA, lipidi

Sestava vsebine vezikla je odvisna od vrste celic iz katerih so vezikli nastali in njihovega patološkega stanja. Zunajcelični vezikli so udeleženi v številnih bioloških procesih, kot so **imunski odziv**, **intracelularna komunikacija in transport**,

metastaziranje, **angiogeneza** **ter preživetje celic**. Lahko so ciljno usmerjeni proti lokalnim celicam ali pa se preko bioloških tekočin prenašajo do celic oddaljenih tkiv. Po vezavi na tarčne celice lahko **ostanejo povezani s plazemsko**

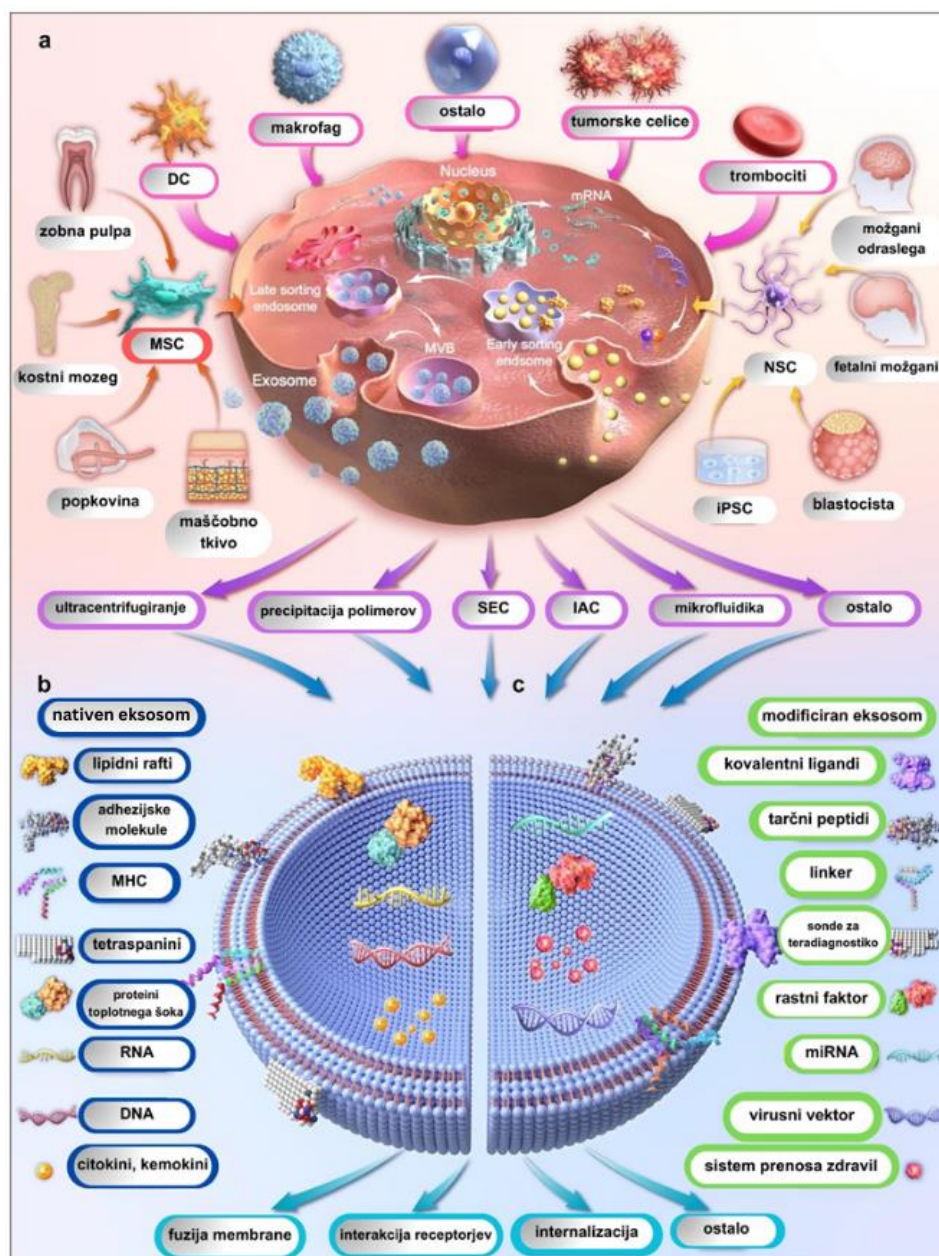
membrano, disociirajo, se neposredno spojijo z membrano ali pa internalizirajo prek endocitotskih poti.

Koristne lastnosti izvenceličnih veziklov pripisujejo ne le njihovi stabilni dostavi citokinov in rastnih dejavnikov, temveč tudi različnim oblikam RNA, ki igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju genske ekspresije. Preko izvenceličnih veziklov MSC izločajo RNA, ki kodira proteine (mRNA) in **nekodirajoče RNA, kot so mikroRNA (miRNA), dolge nekodirajoče RNA (lncRNA) in krožne RNA (circRNA)**. Te komponente so potencialno sposobne izzvati spremembe v delovanju celice preko vpliva na proizvodnjo proteinov ali ekspresijo genov v tarčnih celicah. CircRNA so dolge nekodirajoče RNA molekule, ki so bolj stabilne kot linearne RNA molekule. Do nedavnega so jih obravnavali kot stranske napake transkripcije, zanimanje za njih je naraslo šele z odkritjem njihovega celično specifičnega izražanja v več organizmih. Vplivajo na celično proliferacijo, celični cikel, pluripotentnost in diferenciacijo celic, staranje ter razvoj nekaterih bolezni. Njihov najbolj poznan način delovanja je regulacija izražanja protein kodirajočih genov preko vezave na miRNA. Imele naj bi pomembno vlogo pri razvoju jetrnih bolezni in bi lahko služile kot potencialne tarče zdravljenja.

Nedavni razvoj sekveniranja RNA in tehnik RT-qPCR je omogočil odkrivanje RNA tudi v majhnih količinah. Poleg tega so že dokazali, da se lahko mRNA iz izvenceličnih

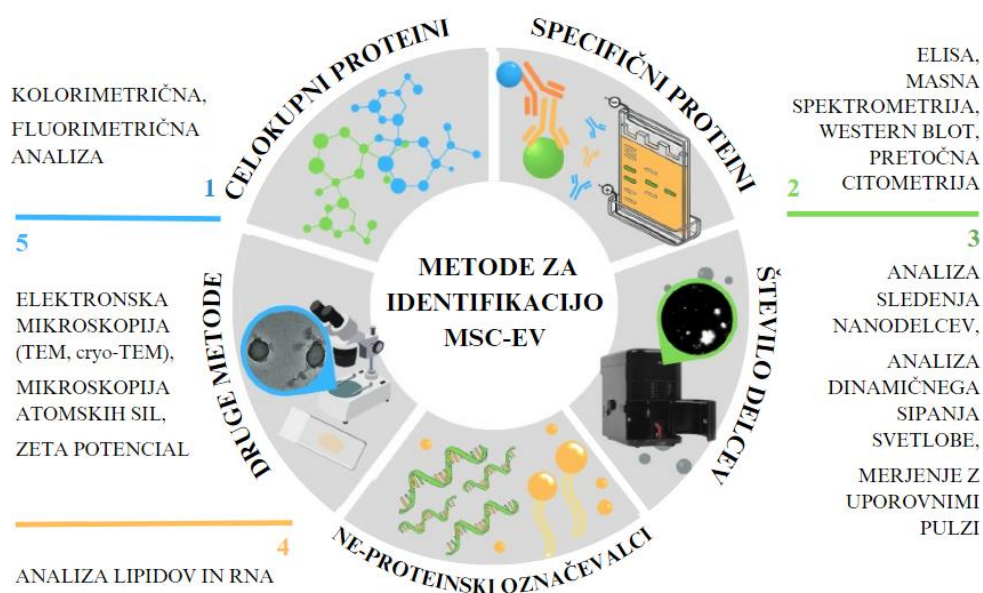
veziklov prenese v drugo celico in nato prevede v beljakovine. Na primer, ledvične tubularne celice brez ekspresije IL-10, so po izpostavitvi zunajceličnim veziklom pridobile mRNA za IL-10 in jo prevedle v omenjeni citokin. **miRNA** so majhne nekodirajoče, visoko ohranjene, enoverižne RNA, ki delujejo na utišanje RNA, poleg tega pa so sposobne uravnavati gensko ekspresijo tudi s posttranskripcijskimi modifikacijami. miRNA se običajno razgradijo hitreje kot mRNA, vendar lahko postanejo bolj stabilne z združevanjem z RNA-vezavnimi proteini (RBP) ali lipoproteini z visoko in nizko gostoto ali z inkapsulacijo. Pokazalo se je, da so miRNA povezane s širokim spektrom bioloških procesov, vključno s celično apoptozo, diferenciacijo matičnih celic, razvojem srčnih in skeletnih mišic, hematopoezo, nevrogenezo, izločanjem inzulina in imunskim odzivom. Zaradi tako pomembnih vlog v fiziologiji jih intenzivno proučujejo tudi kot diagnostične oz. prognostične biološke označevalce.

LncRNA in circRNA sta še dve podskupini majhnih RNA, prisotnih v zunajceličnih veziklih. LncRNA so vključene v celične procese, kot so organizacija kromatina, transkripcija genov, transport mRNA, proizvodnja beljakovin in sestava makromolekularnih kompleksov. circRNA pa imajo dolg razpolovni čas zaradi pomanjkanja prostih koncev, kar preprečuje razgradnjo z eksonukleazami.



Slika 35: Prikaz eksosoma, ki lahko nastane iz katerekoli celice in postopki izolacije/čiščenja eksosomov.

a) Prikaz mezenhimske matične celice (MSC) in nevronske matične celice (NSC) kot celična vira zunajceličnih veziklov. b) Sestava naravnih eksosomov. c) Modificirani eksosomi. Kratice: BM - kostni mozeg, DC - dendritična celica, IAC - imunoafinitetna kromatografija, iPSC - inducirana pluripotentna matična celica, MHC - poglobitni histokompatibilni kompleks, miRNA - mikroRNA, MVB - multivezikularno telo, SEC in IAC - kromatografija



Slika 36: Postopki za identifikacijo zunajceličnih veziklov iz mezenhimskih matičnih celic.

V grobem jih razdelimo na pet skupin: določitev celokupnih proteinov, določitev specifičnih proteinov, določanje števila nanodelcev, določanje ne-proteinskih označevalcev in druge metode.

2.4.2 Pridobivanje in shranjevanje zunajceličnih veziklov

Za ločevanje oziroma koncentriranje zunajceličnih veziklov se pogosto uporablja **ultracentrifugiranje**, ki deluje pri veliko večjih hitrostih in ustvarja večjo silo kot običajno centrifugiranje, ki se uporablja za celice (Slike 35). Običajno se nečistoče posedajo skupaj z vezikli, čemur se delno izognemo z uporabo gradientnega centrifugiranja v saharoznem mediju. Pri **mikrofiltriranju** se vezikli ločujejo po velikosti in glede na sposobnost prehajanja preko fizične ovire, katero predstavljajo filtri ali kolone z različno velikimi porami. Slabost te metode je, da se lahko vezikli poškodujejo, če je uporabljena prevelika sila filtracije in dolg čas delovanja. **Imunoafinitetna izolacija** temelji na prisotnosti specifičnih proteinov na površini zunajceličnih veziklov (CD63, CD81, CD82, D9 in Rab5b).

V primerjavi s celicami, pri katerih pride do zmanjšanja njihovih terapevtske lastnosti zaradi zamrzovanja in odmrzovanja ter uporabe krioprotektantov (npr. DMSO), je **shranjevanje veziklov enostavnejše**. Boljše od zamrzovanja pri -20°C se je obneslo zamrzovanje pri -80°C , saj po 7 mesecih ni imelo bistvenega vpliva na vezikle. Vsekakor bo potrebno izboljšati in poenotiti protokole za shranjevanje, transport in dostavo tovrstnih izdelkov, da bi omogočili ustrezno primerjavo in ter nadaljnji razvoj terapij.

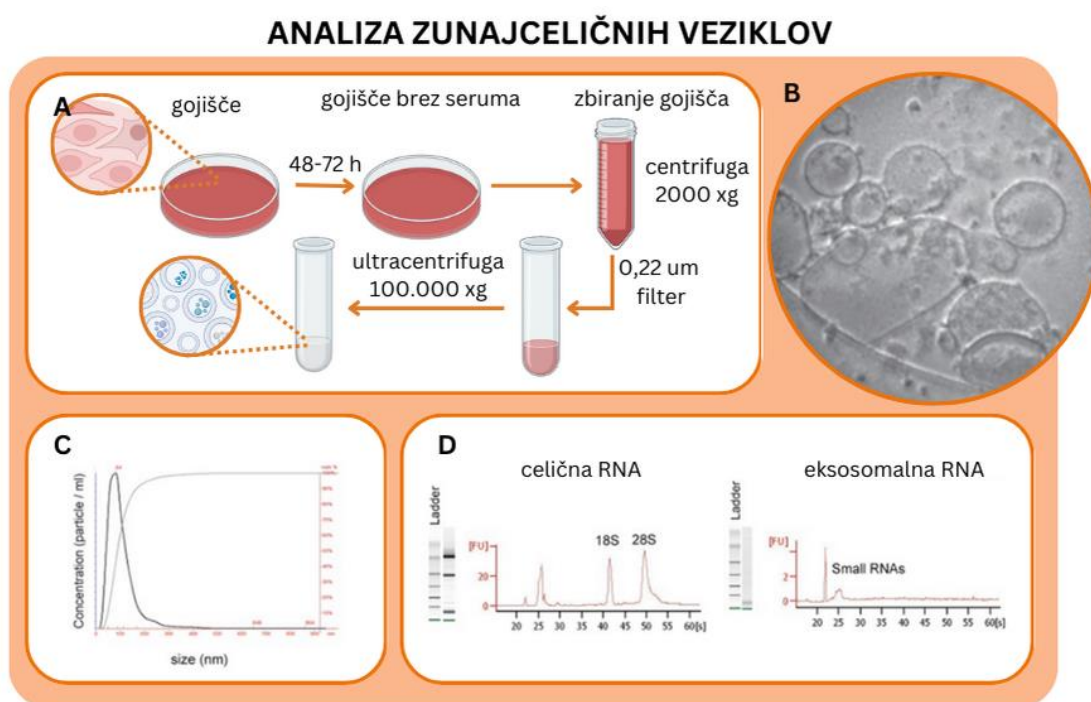
2.4.3 Analize zunajceličnih veziklov

Za ustrezno identifikacijo in oceno terapevtskega potenciala sekretoma MSC potrebujemo standardizirane postopke za zbiranje in identifikacijo želenih molekul. Pri analizi se največkrat določa **velikost in število veziklov, morfologija ter vsebnost RNA, proteinov in lipidov** (Slika 36, 37). Laboratorijski postopki, ki se pri tem

uporabljajo so **elektronska mikroskopija in mikroskopija na atomsko silo**. Ena izmed najpogostejših metod za določanje koncentracije in velikosti veziklov je **optično sledenje posameznemu delcu (angl. Nanoparticle Tracking Analysis – NTA)**. Natančnejša je **pretočna citometrija oziroma slikovna pretočna citometrija**, ki omogoča tako kvalitativne kot tudi kvantitativne odčitke. Določanje proteinske sestave veziklov se lahko opravi s **prenosom Western ali ELISA**.

Glede primerjave vsebine izvenceličnih veziklov iz MSC, pridobljenih iz različnih celičnih virov, zaenkrat podatkov še ni veliko. Zagotovo pa bo potrebno vir celic potrebno prilagoditi specifičnim terapevtskim ciljem.

Poleg pogojev gojenja sta pomembna časovni potek in postopek zbiranja zunajceličnih veziklov, saj se vsebina vezikla lahko s časom spreminja. Trenutno ne obstaja metoda, s katero bi lahko zanesljivo preverili membransko sestavo veziklov, ki lahko vpliva na terapevtsko učinkovitost. Prav tako ni standardnega nabora biomolekul, ki bi jih bilo potrebno identificirati in kvantificirati. V raziskave se tako vključujejo biomolekule po lastni presoji. Poleg tega bo potrebno preveriti tudi potencialno onkogene molekule, saj vsebuje sekretom MSC tudi beljakovine in RNA, ki lahko spremenijo genom prejemnih celic.



Slika 37: Karakterizacija zunajceličnih veziklov po ultracentrifugiranju.

A) Zbiranje gojilnega medija iz celične kulture in ultracentrifugiranje. Postopek je primeren za pridobivanje zunajceličnih veziklov za raziskave, pri čemer pa lahko pride do agregacije in ko-izolacije topnih dejavnikov in proteinov. Za uporabo v terapevtske namene je ta postopek preveč zamuden. B) Morfologija izoliranih zunajceličnih veziklov MSC iz kostnega mozga. Fazno kontrastna transmissijska

elektronska mikroskopija (merilo 200 nm). C) Velikost in število veziklov, določenih z aparatom NanoSight's Nanoparticle Analysis instrument (LH10HS). D) Analiza celokupne količine eksosomske RNA z metodo Agilent RNA Pico chip.

2.4.4 Uporaba zunajceličnih veziklov za zdravljenje

Razlogi za uporabo veziklov mezenhimskih matičnih celic za zdravljenje so podobni razlogom za uporabo mezenhimskih matičnih celic, torej transport in sproščanje bioaktivnih molekul. Lipidni dvosloj ščiti notranjost vezikla pred encimatsko razgradnjo in ohranja njegovo učinkovitost, kar omogoča veziklom, da ostanejo v tkivu še dolgo po sprostitvi iz celic. Specializirani so namreč za transport na dolge razdalje v bioloških tekočinah. Ugotovili so, da vezikli spodbujajo regeneracijo tkiva, sodelujejo pri vnetnem in imunskem odzivu, zaradi česar predstavljajo terapevtski potencial pri zdravljenju širokega nabora bolezni (Slika 38). V primerjavi z MSC imajo vezikli, ki so jih izločile MSC, pri terapevtski uporabi nekatere prednosti, a tudi pomanjkljivosti. Prednosti so **manjša verjetnost pojava stranskih učinkov po aplikaciji, nezmožnost nenadzorovane rasti in tvorbe tumorja, sposobnost prodiranja globlje v tkiva**. Za razliko od celic so vezikli tudi **bolj stabilni ob dolgotrajnem shranjevanju** v zamrznjenem stanju ali pri sobni temperaturi po liofilizaciji. Poleg tega jih je mogoče sterilizirati s filtracijo. Po drugi strani se na področju terapevtske uporabe veziklov srečujemo tudi z različnimi izzivi. **Spontano celično izločanje veziklov pogosto ne zadostuje za pridobivanje količin, ki so potrebne za aplikacijo**. Zato je potrebno za

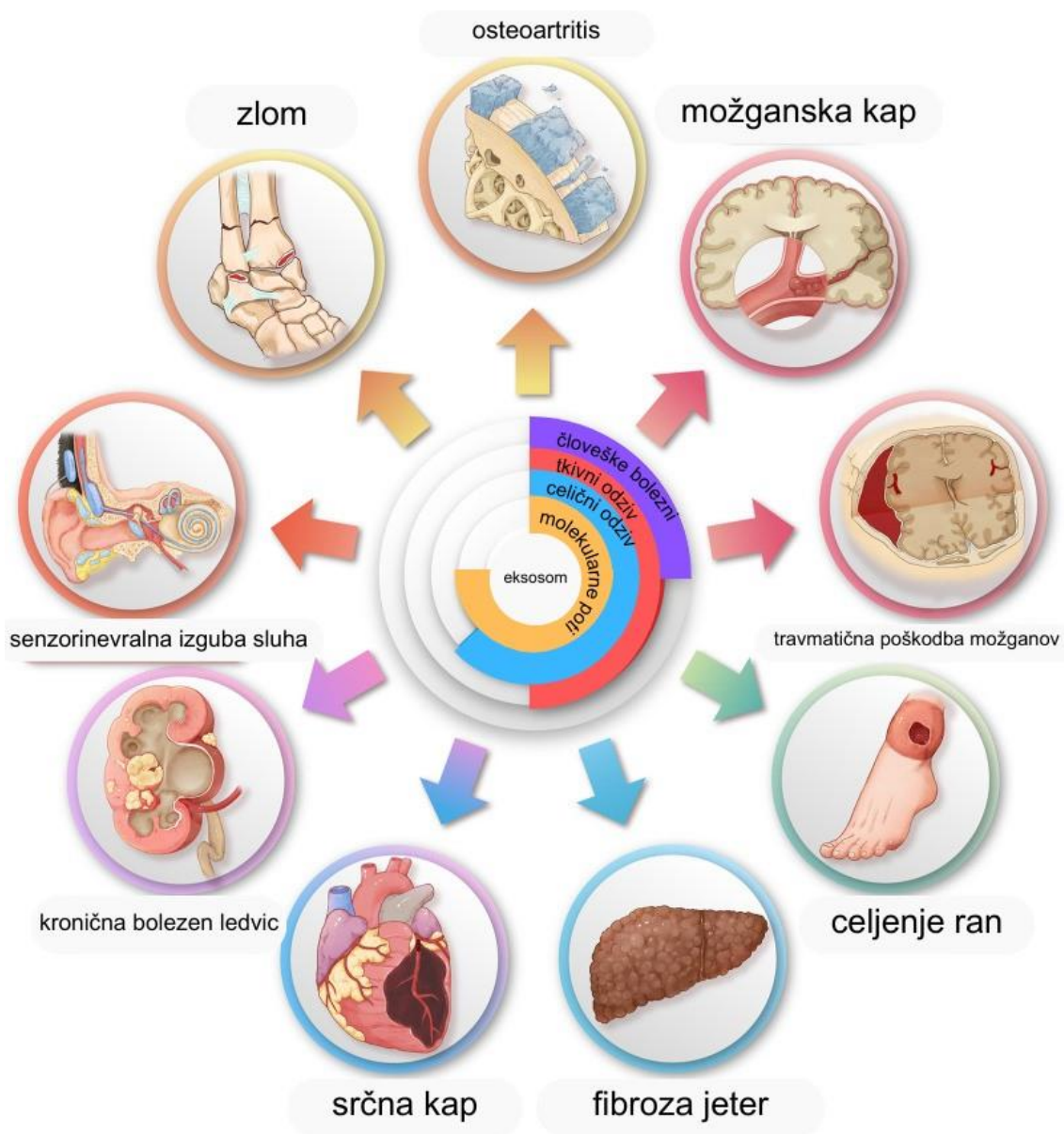
pridobivanje veziklov najprej pripraviti celične kulture. Šele nato lahko nadaljujemo s pridobivanjem zunajceličnih veziklov, kar poleg zbiranja gojišča, v katerega se sproščajo, vključuje tudi različne tehnike koncentriranja, kot so na primer ultracentrifugiranje, in **zahtevne analitske metode, s katerimi določimo količino, velikost in fenotip veziklov**. Kljub raznolikim načinom pridobivanja veziklov, še ni uveljavljene standardizirane metode za njihovo obsežno izolacijo in proizvodnjo.

V večini primerov so obogateno gojišče ali izvencelične vezikle aplicirali s preprosto intravensko injekcijo na mestu poškodbe. Pri uporabi terapevtikov, ki izvirajo iz celic, lahko hidrogelni sistemi omogočijo učinkovitejše zdravljenje s počasnim sproščanjem celičnih proizvodov s čimer se prepreči hitro odstranjevanje z mesta aplikacije ali prezgodnja razgradnja.

Terapevtski učinki zunajceličnih veziklov, izoliranih iz različnih celic se razlikujejo, saj se razlikuje vsebina njihovih veziklov. Zunajcelični vezikli, pridobljeni iz MSC maščobnega tkiva, na primer, bolje spodbujajo angiogenezo kot tisti, pridobljeni iz kostnega mozga. In tako kot mikrokolje v telesu vpliva na lastnosti MSC, so tudi MSC v celičnih kulturah odvisne od zunanjih dražljajev, kar bi v primeru zdravljenja lahko izkoristili tako, da bi s **specifičnimi pogoji gojenja celic vplivali na njihovo specifično delovanje**.

Potekajo že registrirane klinične študije za ocenjevanje učinkovitosti veziklov, in sicer na področju zdravljenja bolnikov z

ishemično kapjo, poškodb oči, pri sladkorni bolezni tipa I, za zdravljenje bolezni presadka proti gostitelju (GvHD).

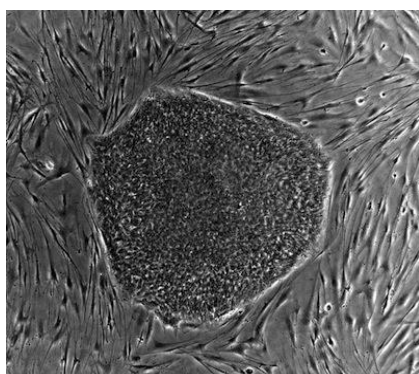


Slika 38: Raziskave uporabnosti eksosomov za zdravljenje.

2.5 PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE

2.5.1 Splošne lastnosti pluripotentnih matičnih celic

Pluripotentne matične celice se lahko diferencirajo v celice endoderma, mezoderma in ektoderma, ne pa tudi v ekstra embrionalna tkiva, in tako lahko iz njih nastanejo katerekoli celice odraslega človeka, kar pomeni več kot 200 različnih tipov celic. Za vzdrževanje pluripotentnosti v celicah so ključni **transkripcijski dejavniki Oct4, Sox2 in Nanog**. **Genom matične celice vsebuje regije, na katere se ti dejavniki vežejo, njihova vezava pa je odvisna od histonskih modifikacij, DNA metilacije in strukturnih sprememb kromatina.** Oblika kromatina embrionalnih matičnih celic ima pomembno vlogo pri vzdrževanju pluripotentnosti, saj ima kromatin edinstvene morfološke značilnosti, kot so prisotnost heterokromatina v večjih, a manj številčnih domenah, ki postanejo tekom diferenciacije manjše, številčnejše in hiperkondenzirane.



Slika 39: Kolonija pluripotentnih matičnih celic, ki za rast v celični kulturi potrebujejo hranilni sloj (inaktivirani fibroblasti, gel).

Pluripotentne matične celice so **embrionalne matične celice (EMC)** (Slika 39). Kljub prednostim pred drugimi matičnimi celicami, je izolacija EMC ter vzdrževanje celične kulture zahtevna, predvsem pa je pridobivanje za nekatere etično sporno, saj gre za celice zarodkov. Obstaja tudi možnost doseganja pluripotentnosti v ne-pluripotentnih celicah s prisilno ekspresijo nekaterih genov in tako dobimo **Inducirane pluripotentne matične celice (angl. Induced Pluripotent Stem Cells - iPSC)**. Gre za pluripotentne matične celice, ki se jih pridobi iz somatskih celic, njihove lastnosti pa so zelo podobne EMC. **Z razvojem metode iPSC so se odprle številne možnosti za proizvodnjo avtolognih celic, primernih za zdravljenje; presaditve EMC so namreč vedno alogenske, saj so pridobljene iz zarodkov.** Z uporabo avtolognih celic se izognemo nevarnosti za imunsko zavrnitev in potrebi po imunosupresivih. Pri uporabi iPSC tudi ni več etičnih pomislekov, ki se pojavljajo pri uporabi EMC.

2.5.2 Zgodovina raziskovanja pluripotentnih matičnih celic

Raziskovalca Martin Evans in Matthew Kaufman sta leta **1981 prva izolirala embrionalne celice iz mišjih zarodkov**. Istočasno jih je izolirala tudi Gail R. Martin, ki je prva uporabila izraz embrionalna matična celica. Leta **1998 je James Thompson opisal tehniko za izolacijo celic iz notranje celične mase človeških blastocist in razvil prve linije človeških EMC**.

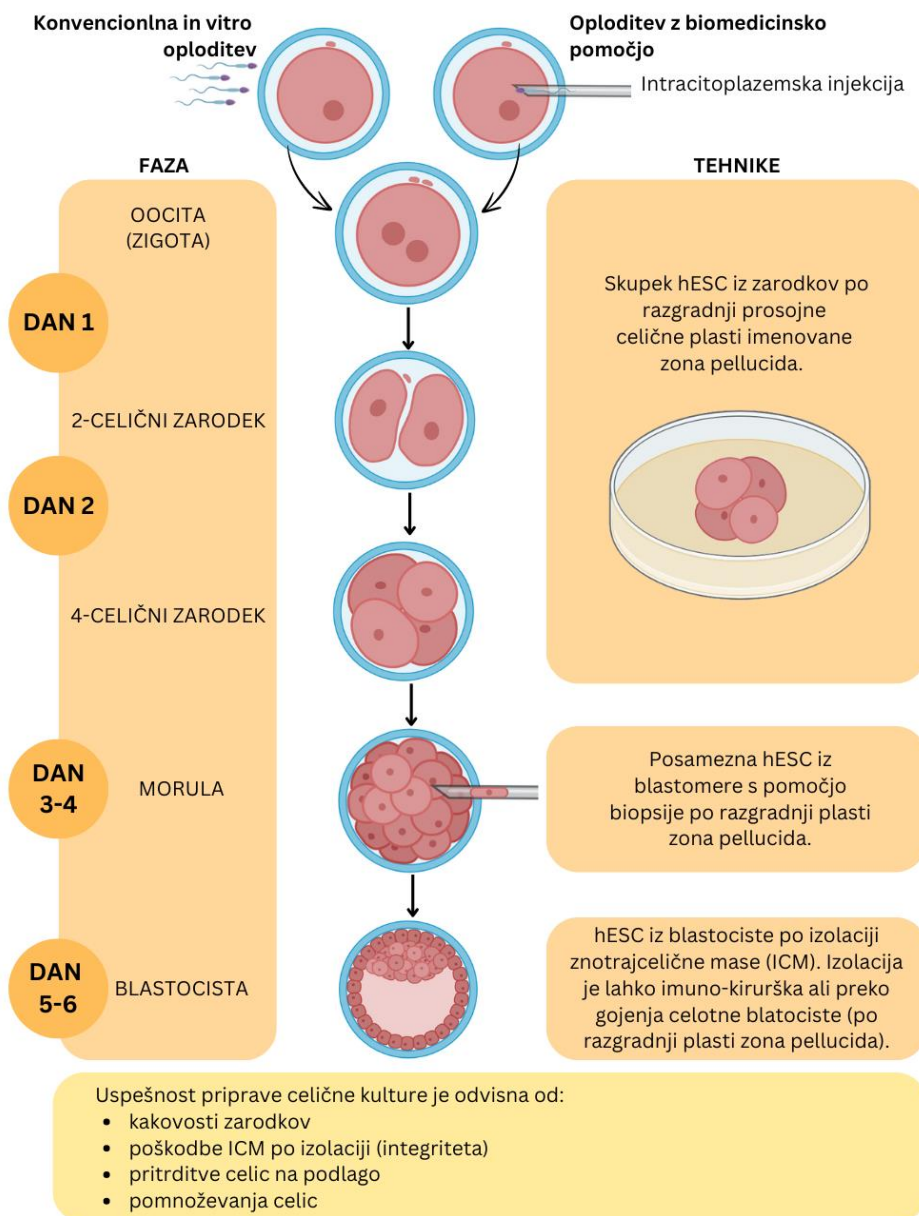
Sprva so verjeli, da dokončno diferencirane celice ne morejo več pridobiti pluripotentnih lastnosti in se spremeniti v nov organizem. Vendar je Guordon leta 1962 uspel vzgojiti paglavca iz neoplojene jajčne celice, v katero je vstavil jedro diferencirane celice žabe. Te raziskave so nadgradili pri kloniranju, ko je bila z metodo prenosa jedra somatske celice v neoplojeno jajčno celico ustvarjena ovca Dolly. Raziskovalca Takahashi in Yamanaka sta leta **2006 uspešno inducirala stanje pluripotentnosti v mišjih fibroblastih, z izražanjem točno določenih transkripcijskih dejavnikov v *in vitro* pogojih**. Zbrala sta 24 kandidatnih genov, ki bi lahko inducirali pluripotentnost v celici in z virusnimi vektorji vnašala različne kombinacije genov v mišje fibroblaste. **Dejavniki Oct3/4, Sox2, Klf4 in c-Myc so v mišjih fibroblastih povzročili pluripotentnost**. Tako nastale celice so poimenovali **inducirane pluripotentne**

matične celice. Takahashi in sodelavci so nato že leto kasneje reprogramirali tudi človeške dermalne fibroblaste in dokazali njihovo sposobnost diferenciacije v celice vseh treh zarodnih plasti.

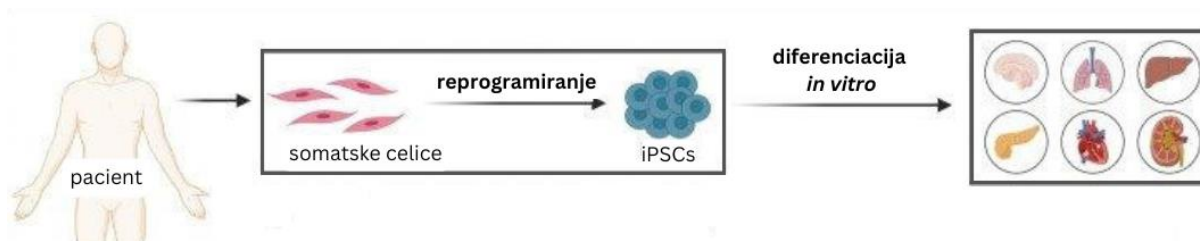
2.5.3 Embrionalne matične celice

Embrionalne matične celice se nahajajo v embriju ali zarodku. Z izolacijo celic znotrajcelične mase zarodka in z gojenjem celic pridobimo celično linijo embrionalnih matičnih celic, ki jih lahko uporabljamo za namene preučevanja molekularnih mehanizmov pluripotentnosti in diferenciacije ali za zdravljenje.

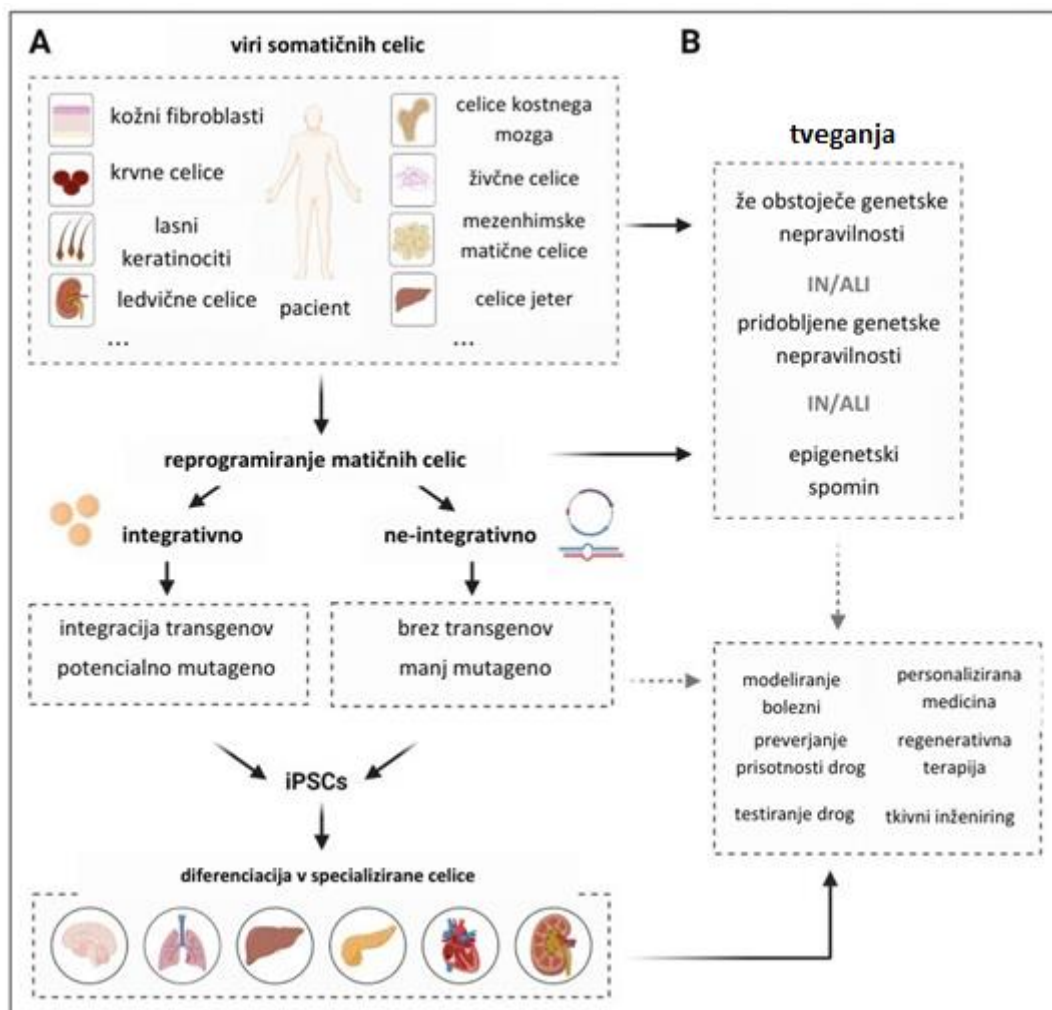
Priprava EMC se prične z oplojeno jajčno celico. Ob oploditvi nastane zigota, ki se deli v totipotentne celice. Iz njih se razvijejo zarodek, ekstraembrionalne membrane in posteljica. Celice se nato delijo, kar vodi do nastanka zgodnje morule, in nato zrele blastociste. To privede do nastanka znotrajcelične mase (angl. Inner Cell Mass, ICM) in zunanjšega sloja celic-trofoblast, ki prispeva k nastanku posteljice. Vmes se nahaja s tekočino napolnjena votlina, imenovana blastocel (Slika 40). EMC najpogosteje pridobimo iz znotrajcelične mase blastociste v pogojih *in vitro*. Zarodek, ki je ob pripravi celične kulture star nekaj dni, z izolacijo celic uničimo. Celice ločimo od trofoektoderma in prenesemo v gojišče.



Slika 40: Pridobivanje embrionalnih matičnih celic in priprava celične culture.



Slika 41: Avtologne inducirane pluripotentne matične celice (iPSC).



Slika 42: Različni načini priprave iPSC in njihova uporaba v medicini.

2.5.4 Inducirane pluripotentne matične celice (iPSC)

Za reprogramiranje somatskih celic v iPSC so potrebni transkripcijski dejavniki **Oct3/4, Sox2, Klf4 in cMyc**. S prekomernim izražanjem teh dejavnikov je mogoče diferencirane somatske celice spremeniti v pluripotentne. Vezava cMyc na DNA omogoči tudi vezavo Oct4 in Sox2, ki imata dostop do genov za reprogramiranje, temu pa sledi utišanje genov, ki vzdržujejo diferencirano stanje somatskih celic, za kar je odgovoren Klf4, ki tudi spodbuja endogeno ekspresijo Oct4

in Sox2. Poleg transkripcijskih dejavnikov Oct4, Sox2 in Nanog pri vzdrževanju pluripotentnosti sodelujejo tudi druge signalne molekule. Za reprogramiranje somatskih celic v iPSC so dovolj že omenjeni štirje transkripcijski dejavniki.

Za vnos transkripcijskih dejavnikov so potrebni vektorji. Razvili so postopke za reprogramiranje z uporabo **integrirajočih in ne integrirajočih metod**. Sprva so iPSC pridobivali z **integrirajočimi virusnimi vektorji, kot so retrovirusi**. Njihova pomankljivost je omejena ekspresija vstavljenih genov, vplivajo pa lahko tudi na

nastanek tumorjev. Učinkovitejši so **lentivirusi**, saj zagotavljajo od 0,1% do 1% uspešnost reprogramiranja. Uporabljeni so bili tudi **ne-integrirajoči adenovirusi**, kjer se vnešena DNA ne vgradi v gostiteljski genom, kar zagotavlja večjo varnost. Ta postopek je zato primernejši za uporabo v klinične namene, vendar je težava zelo nizka uspešnost reprogramiranja. Za klinične namene je bolj varna uporaba ne virusnih vektorjev, kot so **plazmidi**, ki kodirajo potrebne transkripcijske dejavnike, citoplazemsko RNA in episomalno DNA. Tudi pri teh metodah ne pride do vgrajevanja v genom, težava ostaja učinkovitost, ki je še nižja kot pri ostalih metodah. Dokazano je bilo **reprogramiranje z neposrednim vnosom proteinov**, možna rešitev pa bi bila tudi uporaba **sintetične RNA, mRNA in miRNA**.

Trenutno je najbolj varna in učinkovita metoda za pridobivanje iPSC je uporaba vektorjev virusa Sendai, saj pri tem ne pride do integracije v gostiteljski genom, hkrati pa zagotovljena 1% učinkovitost reprogramiranja. Znano je tudi, da uporaba nekaterih kemikalij zmanjša količino dejavnikov, potrebnih za indukcijo pluripotentnosti.

Pluripotentne matične celice v odraslem organizmu

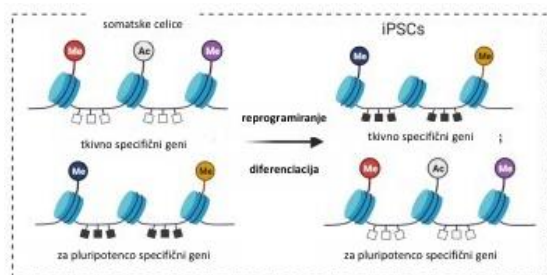
Nekateri znanstveniki so dokazali obstoj pluripotentnih matičnih celic v odraslih

tkivih človeka, ki naj bi se kot rezerva ohranile iz embrionalnega obdobja življenja. Poimenovali so jih **VSEL celice** – (angl. Very Small Embryonic-Like) in jih izolirali iz kostnega mozga, krvi, jajčnikov, mod, popkovnične krvi.

2.5.5 Identifikacija pluripotentnih matičnih celic

Pluripotentne celice lahko za razliko od ostalih matičnih celic določimo v celični kulturi na osnovi morfoloških značilnosti. Celice so namreč relativno majhne, razmerje med velikostjo jedra in citoplazmo je veliko, in v celični kulturi tvorijo **embrioidna telesca – skupek hitro se delečih celic, ki jih lahko opazujemo s svetlobnim mikroskopom** (Slika 39). Natančneje jih analiziramo z uporabo imunofluorescence, kjer določamo prisotnost antigenov **Tra-1-60, Tra-1-81**. Lahko sledimo tudi transkripcijskim dejavnikom **OCT-4, NANOG, SOX-2**. Druge metode so še določanje **aktivnosti alkalne fosfataze in telomeraze**, izražanje mRNA, RT-PCR: **Oct-4, Sox-2, Nanog, Rex-1, GAPDH, ACTB, DNMT3B, epigenetskih sprememb** (Slika 43).

Ključni dokaz pluripotentnosti celic so funkcijski testi, kot so diferenciacija celic v vse zarodne plasti in vitro ter teratoma test in vivo (injiciranje celic v miško SCID/NOD z zmanjšano imunsko odpornostjo).



Slika 43: Epigenetske spremembe med reprogramiranjem in diferenciacijo celic.

2.5.6 Uporaba pluripotentnih matičnih celic za zdravljenje

Možnost uporabe celic, ki se lahko spremenijo v vsako celico, ki jo v določenem trenutku potrebujemo, se zdi zelo mikavna za zdravljenje bolezni, poškodb, stanj povezanih s staranjem itd. Do takrat potrebno premagati še kar nekaj ovir. Velik napredek je bil dosežen z odkrivanjem novih nevirusnih in neintegracijskih metod indukcije pluripotentnosti celic. **Med najbolj perspektivne metode, ki bi bile lahko uporabne za klinične namene pridobivanja iPSC celic, sodi indukcija s proteini ali z mikro RNA.** iPSC celice bi bilo možno pripraviti iz bolniku lastnih celic. S tem bi se med zdravljenjem izognili uporabi imunosupresije, čeprav so poročali o primerih, ko so avtologni presadki izzvali imunski odgovor zaradi epigenetskih sprememb, somatskih mutacij ali zaradi genetske nestabilnosti iPSC. Slaba plat avtolognih terapij so visoki stroški ter čas, ki je potreben za pripravo celic. Prav zato je priročnejša **alogenska terapija**. Za preprečitev zavrnitve presadka je potrebna sistemska imunosupresija z zdravili, kar vključuje dodatna tveganja za zdravje bolnikov. V

bodočnosti bo za tovrstna zdravljenja pomembna selekcija darovalcev tkiv za pripravo iPSC. Z razvojem metode editiranja genoma pa se je pojavila tudi možnost, da pripravimo modele s personaliziranim genotipom.

2.5.7 Kontrola kakovosti celičnega pripravka

Ker diferenciacije *in vitro* običajno ni popolnoma učinkovita, obstaja verjetnost, da v celični kulturi ostane nekaj iPSC ali ne dovolj diferenciranih, kar lahko povzroči hude zaplete v primeru uporabe celic v terapevtske namene. Zato je nujen razvoj ustreznih laboratorijskih metod, s katerimi zaznamo in **odstranimo nediferencirane iPSC iz končnega produkta za presaditev**. Zmožnost neskončnega deljenja pluripotentnih celic omogoča pridobivanje velikega števila celic. Ta lastnost pa ima lahko tudi negativne učinke, saj lahko iPSC povzročijo **nastanek tumorjev** v prejemniku.

iPSC so najpogostejše uporabljene celice za pripravo bioinženirskih modelov, s katerimi posnemamo strukture in funkcije organov.

2.6 ORGANOIDI

Najenostavnejši model za raziskovanje celic je gojenje v dvodimenzionalnem sistemu v enoslojni celični kulturi. Vendar ti pogoji ne posnemajo kompleksnih reakcij, ki potekajo v tridimenzionalnem (3D) okolju človeškega telesa. Za napovedovanje terapevtskih odzivov pri ljudeh se živalski modeli niso izkazali kot najbolj primerni, ob tem lahko problem predstavlja tudi etični vidik teh raziskav. **Pri raziskavah uporabnosti celic za zdravljenje je zato pomembno, da jih izvajamo s človeškimi celicami, pri tem pa upoštevamo tudi medsebojne interakcije več različnih tipov celic in se tako kar najbolj približamo *in vivo* pogojem. To lahko dosežemo v 3D okolju.**

Med najpogostejše uporabljene 3D-modele *in vitro* sodijo **organi na čipih (angl. organ-on-a-chip), 3D-kulture ali sokulture na bioloških** (npr. kolagen, matrigel, želatina) **ali sintetičnih nosilcih** (npr. polietilen glikol, polilaktična kislina), **sferoidi in organoidi**. Sferoidi nastanejo s spontanim ali prisilnim združevanjem celic v celični kulturi. Celice same vzpostavijo 3D mikrookolje z izločanjem komponent zunajceličnega matriksa.

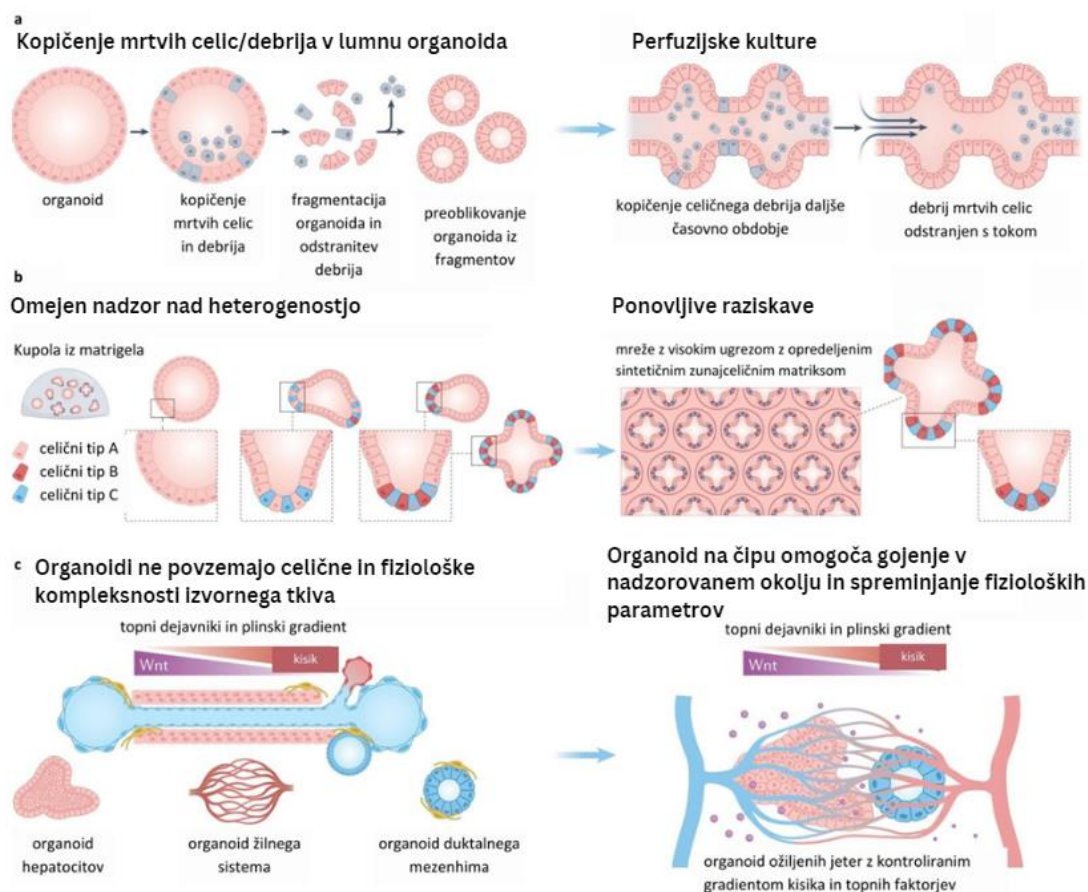
Organoidi so tridimenzionalni skupki celic, ki v *in vitro* pogojih predstavljajo model za organe. Ker so njihove lastnosti podobne človeškemu organom, lahko z organoidi ponazorimo njihovo delovanje, kar

omogoča njihovo uporabo tako v modeliranju bolezni, kot tudi v regenerativni medicini. Organoidi pripravljajo iz **EMC ali iPSC**, kjer celice najprej pomnožujejo v skupkih in nato diferencirajo. Ena od težav predstavlja pojav nekroze v osrčju organoida, saj niso vaskularizirani in tako se dostopnost hranil z večanjem organoida zmanjšuje.

iPSC bi lahko pripravili tudi iz somatskih celic pacientov, tako pridobljeni organoidi bi izražali lastnosti obolelih organov, kar bi bilo uporabno pri testiranju zdravil, raziskovanju bolezni in za zdravljenje.

V *in vitro* pogojih jim je uspelo ustvariti možganske strukture, ki ponazarjajo možgansko skorjo in glialne celice, kar bi bilo uporabno v raziskavah razvoja in motenj možganov. iPSC se lahko diferencirajo v tkiva, ki so podobna polariziranemu črevesnemu epitelu in kažejo lastnosti, kot sta absorpcija in izločanje snovi, model pa se je še izboljšal v kombinaciji z živčnimi celicami. Tkiva so kazala različne lastnosti črevesja, med drugim krčenje.

Možna je tudi diferenciacija iPSC v srčne organoide, ki služijo za modeliranje regeneracije kardiomiocitov po poškodbi. Pripravili so tudi jetrne in ledvične organoide ter še številne druge.



Slika 44: Pomankljivosti celičnih kultur organoidov in sodobni pristopi za njihovo odpravo (mikrofluidne naprave organ-na-čipu ali organski čip).

2.7 NEVRONSKE MATIČNE CELICE

Nevronske matične celice (NSC, ang. neural stem cells) so multipotentne celice, iz katerih se med embriogenezo razvijejo različne celice živčnega sistema. Prisotne so predvsem v zgodnjih fazah razvoja, vendar jih najdemo tudi v določenih regijah odraslih možganov, na primer v hipokampusu in subventrikularni coni. V odraslem organizmu se lahko aktivirajo kot odgovor na poškodbe in bolezni. Njihova ključna funkcija je namreč nadomeščanje poškodovanih ali odmrlih celic živčnega sistema, kar omogoča ohranitev delovanja sistema tekom življenja.

Nevronske matične celice je mogoče izolirati iz tkiva ter jih gojiti v celični kulturi. Lahko jih pridobimo tudi iz iPSC. Sposobne so diferenciacije *in vitro* v astrocite, oligodendrocite in druge celice živčnega tkiva. Po presaditvi v miši so bile NSC sposobne nadomestiti delovanje poškodovanih oligodendrocitov. Presaditev nevronske matične celice preučujejo kot potencialni alternativni način zdravljenja in čeprav je to področje še v povojih, so v nekaterih raziskavah že potrdili pozitivni učinek presajenih celic na bolnike. Raziskave so osredotočene predvsem na zdravljenje poškodb in nekaterih bolezni centralnega živčnega

sistema. Čeprav se NSC lahko diferencirajo v živčne celice, še ni dokazov, da lahko presajene celice dejansko nadomestijo nevrone. Prav zaradi tega intenzivno proučujejo njihovo diferenciacijo v pogojih *in vitro*, kakor tudi migracijo presajenih celic.

2.7.1 Raziskave uporabe nevronske matične celice za zdravljenje

V predkliničnih raziskavah so ugotovili, da je pozitiven učinek presajenih celic v telesu posledica različnih mehanizmov, **najpogostejše v obliki proizvodnje nevrotrofičnih dejavnikov in zmanjšanja vnetja na mestu poškodbe**. Potekajo že tudi klinične študije za zdravljenje nekaterih bolezni in poškodb centralnega živčnega sistema.

Parkinsonova bolezen je nevrodegenerativna bolezen, ki povzroča postopno izgubo dopaminergičnih nevronov v možganih, kar vodi do motenj gibanja, tremorjev in togosti. V kliničnih študijah presajajo nevrone matične celice v bazalne ganglije možganov, kjer naj bi se diferencirale v dopaminergične nevrone in tako nadomestile izgubljene celice.

Pri **Alzheimerjevi bolezni** prihaja do postopnega odmiranja nevronov zaradi kopičenja patoloških beljakovin (beta-amiloid in tau). Raziskave preučujejo možnost uporabe NSC za regeneracijo prizadetih predelov možganov, predvsem hipokampusa, kjer je shranjevanje spomina najbolj prizadeto. Trenutno študije kažejo, da so NSC bolj kot za nadomeščanje izgubljenih živčnih celic uporabne zaradi svoje sposobnosti

sproščanja nevrotrofičnih dejavnikov, ki lahko upočasni napredovanje bolezni.

Poškodbe hrbtenjače so pogosto nepovratne, saj nevroni v tej regiji niso sposobni regeneracije. NSC se uporabljajo za obnovo povezav v poškodovanih predelih hrbtenjače, zlasti z diferenciacijo v oligodendrocite, ki tvorijo mielin, pomemben za hitro prevajanje živčnih signalov. Klinične študije preučujejo, kako lahko presajene NSC izboljšajo delovanje po poškodbi hrbtenjače in povrnejo delno gibljivost ter občutek.

Multipla skleroza je avtoimunska bolezen, pri kateri telo napade in uniči mielinske ovojnice nevronov, kar vodi do motenj v prenosu signalov po živčnih vlaknih. Terapija z NSC se preučuje kot možnost za popravilo teh ovojnic z diferenciacijo v oligodendrocite, ki bi lahko obnovile mielin.

Kljub potencialu NSC za celične terapije se znanstveniki soočajo s številnimi izzivi. Eden glavnih problemov je **nadzor nad diferenciacijo, predvsem to velja pri uporabi iPSC, saj nepravilna diferenciacija lahko privede do neustreznega delovanja celic ali celo nastanka tumorjev**. Poleg tega je pomembno zagotoviti, da **presajene celice tvorijo ustrezne sinaptične povezave z obstoječimi nevroni**, saj brez tega ne morejo funkcionalno prispevati k obnovi poškodovanega tkiva.

Vendar so rezultati kliničnih in predkliničnih študij obetavni. Napredek na **področju biomaterialov, genske terapije, in biotehnologije** nudi dodatne možnosti

za izboljšanje uspešnosti celičnih terapij z NSC.

2.8 NOSILNI MATERIALI ZA CELICE

Po presaditvi celic v telo se lahko srečamo s težavami kot so **zadrževanja celic na mestu aplikacije, nizka stopnja preživetja celic ali njihova neustrezna diferenciacija**. Po drugi strani pa je eden od glavnih izzivov pri celičnih terapijah zagotavljanje zadostnega števila presajenih celic, saj le tako dosežemo želen učinek. **Z uporabo naosilnih materialov za celice lahko vplivamo na število, preživetje, migracijo in diferenciacijo presajenih celic, s čimer izboljšamo in pospešimo regeneracijo tkiva.**

Nosilni materiali med nastajanjem novega tkiva nadomeščajo funkcije zunajceličnega matriksa *in vitro* ali *in vivo*. Zunajcelični matriks ali medceličnina je dinamično omrežje različnih makromolekul in je značilen za posamezno tkivo. Pretežno je sestavljen iz kolagenov, proteoglikanov, elastina, glikoproteinov in drugih tkivno specifičnih komponent, ki zagotavljajo mehansko oporo celicam in njihovo funkcionalnost. Celice lahko v zunajcelični matriks izločajo molekule, s čimer povzročijo konformacijske spremembe sestavin matriksa ter sprožijo kemijske signale, ki regulirajo proliferacijo, diferenciacijo, adhezijo, migracijo, polarnost in apoptozo celic. Zunajcelični matriks služi tudi kot medij za transport hormonov, rastnih dejavnikov in drugih bioaktivnih molekul do tarčnih celic.

Univerzalni nosilni material za celice ne obstaja, saj imajo različni tipi celic različne potrebe in jim je potrebno najustreznejši nosilni material poiskati in prilagoditi. Na splošno pa so **zaželenе lastnosti nosilnih materialov za celice sledeče:**

- primerna **poroznost**, da celice lahko migrirajo,
- primerna **površina materiala**, ki omogoča pritrditev, pomnoževanje, diferenciacijo celic,
- **biokompatibilnost** oziroma dober stik z tkivom v telesu,
- po vsaditvi mora nosilni material ohraniti **mehanske lastnosti** vse dokler ni več potreben, nato se mora **absorbirati in izločiti iz telesa**, ne da bi pustil sledi,
- **ne sme povzročati vnetnega ali toksičnega odziva**,
- **enostavna sterilizacija**.

Tkivno inženirstvo je interdisciplinarno področje, ki se ukvarja z razvojem in pripravo tkivnih nadomestkov. Regeneracijo tkiva tako dosežemo s **kombinacijo ustreznih nosilcev (sintetičnih ali bioloških), enega ali več tipov celic in bioaktivnih molekul**. Biološki materiali so pogosta izbira v tkivnem inženirstvu, saj vsebujejo naravne bioaktivne molekule, ki spodbujajo rast in diferenciacijo celic. Njihova slabša plat je zahtevnejša standardizacija priprave za uporabo zaradi biološke variabilnosti.

2.8.1 Naravni materiali

- **fibrin** (polimerizirana oblika fibrinogena, avtolognost, cenovno dostopen)

- **kolagen** (primeatearna sestavina zunajceličnega matriksa naravna adhezivna površina za Kolagenska vlakna zagotavljajo strukturno in biološko podporo tkivom z uravnavanjem celične morfologije, adhezije, kemotakse, migracije in diferenciacije.
- **želatina** (denaturiran kolagen, sposobnost absorbiranja velikih količin vode, cenovno dostopen material)
- **alginat** (polisaharid iz alg)
- **agaroza** (polisaharid iz alg, težko razgradljiva)
- **celuloza** (polimer iz D-glukoz, težko razgradljiva)
- **hialuronska kislina** (polisaharid, sestavljen iz N-acetil D-glukozamina in D-glukuronske kisline, ki sta večkrat povezani z glikozidnimi vezmi glavnih funkcij hialuronske kisline v tkivih je transport vode
- **svila** (sestavlja jo fibroin, ki je znan po svojih ugodnih mehanskih lastnostih, visoko natezno trdnostjo, odpornostjo na vodo in večino organskih topil ter stabilnostjo pri višjih temperaturah)

Naravni nosilni materiali so lahko tudi **prečiščene kosti, žile, amnijska membrana** in druga tkiva. Od bioloških materialov se amnijska membrane najbolj vsestransko uporablja, njeno pridobivanje je enostavno in glede na to, da se posteljica po porodu zavrže, ni etično sporno. Enostavno je tudi njeno procesiranje in shranjevanje.

2.8.2 Postopki decelularizacije tkiva

Decelularizacija tkiva, ki ga želimo uporabiti kot nosilni material, poteka na

dva načina in sicer s predhodnim drobljenjem tkiva ali neposrednim čiščenjem organa. Drobljena tkiva nato rekonstruiramo in uporabimo kot dodatek substratu za celične kulture ali hidrogel za injiciranje, saj izboljšajo proliferacijo, diferenciacijo celic ali druge lastnosti celic. Decelularizirani organi pa ohranijo svojo 3D strukturo, kamor lahko nasadimo različne tipe celic, ki so potrebni za regeneracijo tkiv.

Postopki decelularizacije so odvisni od vrste tkiva. **Na voljo so kemijske, fizikalne oz. mehanske, biološke in encimske metode, za izolacijo pa se najpogosteje uporablja kombinacija dveh ali več metod. Encimska razgradnja** lahko izboljša decelularizacijo z uporabo enega ali kombinacije več encimov. Omogoča lažjo difuzijo decelularizacijskih sredstev preko tkiv, kar je še posebno uporabno pri decelularizaciji gostih in kompleksnih tkiv. Slabost encimske razgradnje je povečano tveganje strukturnih in proteomskih sprememb v medceličnini. Primeri encimov: tripsin, EDTA, nukleaze.

Uporaba kemijskih sredstev je med najpogostejšimi metodami decelularizacije, predvsem zaradi hitrega in učinkovitega odstranjevanja celic iz tkiv. A pogosto ta sredstva ne odstranijo vsega celičnega materiala in tako ostanejo sledi dsDNA, mitohondrijske DNA, membranskih fosfolipidov ipd., ki lahko povzročijo imunski odziv in otežijo postopke recelularizacije. Sredstva so toksična in jih je po uporabi potrebno dobro sprati. Delimo jih na različne vrste detergentov, topila, kisline, baze, hiper- in hipotonične raztopine.

Fizikalne metode temeljijo na prekinitvi membran in ustvarjanju neugodnih pogojev za celice, ki inducirajo apoptozo. Same po sebi navadno niso zadostne, saj ne omogočijo popolne odstranitve celic in njihovih ostankov, zato jih uporabljamo v kombinaciji z drugimi metodami. Primeri teh metod so uporaba vakuma, visok hidrostatski tlak, cikli zamrzovanja in odmrzovanja in ultrazvočno razbijanje.

Biološke metode se osredotočajo na induciranje apoptoze celic. Po delovanju sredstev za induciranje apoptoze ostanejo delci celic, ki jih odstranimo. Mednje sodijo citotoksična sredstva, vodikov peroksid in ustvarjanje hipoksičnih pogojev. Uporabljajo se predvsem v kombinaciji z drugimi metodami.



Slika 45: Nosilni materiali za celice.

2.8.3 Sintetični nosilni materiali

Uporaba sintetičnih materialov omogoča večji nadzor nad lastnostmi, kot so razgradljivost, trdnost in poroznost materiala. Njihova slabost pa je lahko **manjša biokompatibilnost** v primerjavi z naravnimi polimeri in potencialno zavračanje materiala s strani telesa. Sintetični biomateriali, kot so polimlečna kislina (PLA), poli(mlečna ko-glikolna kislina) (PLGA) in poliglikolna kislina (PGA),

čeprav je njihova priprava cenejša od priprave naravnih materialov, nimajo prepoznavnih vezavnih mest za celice, kar ima za posledico zmanjšano bioaktivnost.

Lastnosti nosilnega materiala lahko izboljšamo z **uporabo bioaktivnih molekul**. Vključevanje rastnih dejavnikov, proteinov ali drugih bioaktivnih molekul v nosilni material lahko spodbudi celice k adheziji, migraciji in diferenciaciji. Na primer, vključitev nevrotrofičnih dejavnikov v materiale za regeneracijo

živčnega tkiva lahko izboljša preživetje in diferenciacijo nevronske matične celice.

S pomočjo **3D tiskanja** lahko natančno ustvarimo strukture, ki posnemajo naravno arhitekturo tkiv. To omogoča boljšo prilagoditev materialov specifičnim tkivom in potrebam pacienta. Prav tako 3D tiskanje omogoča ustvarjanje zelo kompleksnih poroznih struktur, ki olajšajo celično infiltracijo in rast.

Razvoj **pametnih materialov**, ki se odzivajo na spremembe v okolju, kot so pH, temperatura ali mehanske sile, je eden izmed glavnih ciljev razvoja interaktivnih materialov. Ti materiali lahko sproščajo bioaktivne snovi ali spremenijo svoje lastnosti kot odgovor na specifične dražljaje, kar omogoča prilagajanje materiala med procesom regeneracije tkiva.

3. LITERATURA

- Abouelkheir M, ElTantawy DA, Saad MA et al. Mesenchymal stem cells versus their conditioned medium in the treatment of cisplatin-induced acute kidney injury: evaluation of efficacy and cellular side effects. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2016; 9(12):23222-34.
- Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014; 5(2): 53.
- Anthony BA and Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in Immunology*. 2014; 35(1):32-7.
- Bader P, Kuci Z, Bakhtiar S et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant* 2018; 53:852-862.
- Bae KS, Park JB, Kim HS et al. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*. 2011; 52:401-412.
- Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R et al. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cells manufactured for therapeutic applications. *Stem Cell Reviews* 2016 12; 394–420
- Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R et al. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cells manufactured for therapeutic applications. *Stem Cell Reviews*. 2016; 12: 394–420.
- Bashor CJ, Hilton IB, Bandukwala H, Smith DM, Veiseth O. Engineering the next generation of cell-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2022 Sep; 21(9):655-675.
- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2011 2; 2: 403–430
- Billing AM, Ben Hamidane H, Dib SS et al. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Scientific Reports*. 2016; 6(1), article 21507
- Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 2010; 5:e14247.
- Butler J, Epstein SE, Greene SJ et al. Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Cardiomyopathy: Safety and Efficacy Results of a Phase II-A Randomized Trial. *Circ Res* 2017; 120:332-340.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 1991; 9(5):641–50.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*. 2017; 6(6):1445-51.
- Chen WCW, Baily JE, Corselli M et al. Human myocardial pericytes: multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity. *Stem Cells*. 2015; 33(2):557-73.
- Cheng X, Zhang G, Zhang L et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018 22; 1: 261–276.
- Čamernik K, Barlič A, Drobnič M et al. Mesenchymal stem cells in the musculoskeletal system: From animal models to human tissue regeneration? *Stem Cell Rev Rep* 2018; 14(3): 346-369
- Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015 Apr 23; 125(17):2605-13.
- Fernandez-Rebollo E, Mentrup B, Ebert R et al. Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep* 2017; 7:5132.
- Fitzsimmons REB, Mazurek MS, Soos A, Simmons CA. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2018; 2018:8031718.
- Flemming A, Schallmoser K, Strunk D et al. Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J Clin Immunol* 2011; 31:1143-1156.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*. 1970; 3(4):393–403.
- Fujita Y, Tsukasa Kadota Jun Araya, et al. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle-Based Therapeutics for Inflammatory Lung Diseases. *Journal of clinical medicine*. 2018; 7(10):355.

- Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016; 5(12):1620-30.
- Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 2018; 22:824-833.
- Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009; 136:978-989.
- Ha CW, Park YB, Chung JY, Park YG. Cartilage Repair Using Composites of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel in a Minipig Model. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4:1044-1051.
- Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012; 308:2369-2379.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:8932-8937.
- Jarocho D, Milczarek O, Wedrychowicz A, Kwiatkowski S, Majka M. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2015; 24:661-672.
- Jin YZ, Lee JH. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Bone Regeneration. *Clin Orthop Surg*. 2018; 10:271-278.
- Kalladka D, Sinden J, Pollock K et al. Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *Lancet*. 2016; 388:787-796.
- Kandarakov O, Belyavsky A, Semenova E. Bone Marrow Niches of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* 2022; Apr 18; 23(8):4462.
- Kikuchi T, Morizane A, Doi D et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*. 2017 548; 7669: 592-596.
- Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 571-584.
- Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M et al. RNA in extracellular vesicles. *WIREs RNA* 2017; 8(4) article e1413.
- Kobold S, Bultjer N, Stacey G, et al. History and current status of clinical studies using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2023 18; 8: 1592-1598
- Kolenc A, Maličev E. Current Methods for Analysing Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 19; 25(6):3439.
- Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016; 18(1):13-24.
- Krueger TEG, Thorek DLJ, Denmeade SR, Isaacs JT, Brennen WN. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. *Stem Cells Transl Med*. 2018; 7(9):651-63.
- Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 7;20(18):4411.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013 501; 7467: 373-379.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013 501; 7467: 373-379
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16:557-64.
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:557-564.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg Bet al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439-1441.
- Liu Y, Mu R, Wang S et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12:R210.
- Ma YH, Zeng X, Qiu XC et al. Perineurium-like sheath derived from long-term surviving mesenchymal stem cells confers nerve protection to the injured spinal cord. *Biomaterials*. 2018; 160:37-55.
- Madrigal M, Rao KS, and Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*. 2014; 12(1):260.

- Maličev E, Krašna M. Opredelitev krvotvornih matičnih in predniških celic v pripravkih za presaditev. *Zdrav Vestn.* 2018; 87(1–2):58–68.
- Maličev, E; Jazbec, K. An Overview of Mesenchymal Stem Cell Heterogeneity and Concentration. *Pharmaceuticals* 2024; 17: 350.
- Margiana R, Markov A, Zekiy AO *et al.* Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13: 366.
- Matsa E, Holt A. Making the switch from autologous to allogeneic cell therapy. *Cell and Gene Therapy Insights* 2022 8; 8: 935–943.
- Mehler VJ, Burns C, Moore ML. Concise Review: Exploring Immunomodulatory Features of Mesenchymal Stromal Cells in Humanized Mouse Models. *Stem Cells* 2019; 37:298-305.
- Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med.* 2014 Aug;20(8):833-46.
- Momin EN, Vela G, Zaidi HA *et al.* The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of cancer: directions for future research. *Current Immunology Reviews.* 2000; 6(2):137-48.
- Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: an overview. *Transfus Apher Sci.* 2014; Dec; 51(3):68-82.
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI *et al.* Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 2010; 264:171-179.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H *et al.* Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration. *Int Immunopharmacol* 2013; 15:693-702.
- Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H *et al.* Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Letters.* 2015; 589(11):1257-65.
- Nassar W, el-Ansary M, Sabry D *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomaterials Research.* 2016; 20(1):21.
- Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A.* 2013; 83(1):48-61.
- Ng, A., Alexander, W. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov.* 2017; 3: 17002.
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, and Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2011; 12(2):126-31.
- Oliveri RS, Bello S, Biering-Sorensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis.* 2014; 62:338-353.
- Osaka M, Honmou O, Murakami T *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res* 2010; 1343:226-235.
- Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988; 136:42-60.
- Owen M. Marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* 1988; 1988: 63-76.
- Pachler K, Lener T, Streif D *et al.* A Good Manufacturing Practice–grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell–derived extracellular vesicles. *Cytotherapy* 2017; 19(4): 458-72.
- Panes J, Garcia-Olmo D, Van Assche G *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 2016; 388:1281-1290.
- Phelps J, Sanati-Nezhad A, Ungrin M *et al.* Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics. *Stem Cells International* 2018; 9415367.
- Phelps J, Sanati-Nezhad A, Ungrin M *et al.* Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics. *Stem Cells International.* 2018, Article ID 9415367.
- Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; **20**: 303–320.
- Pires AO, Mendes-Pinheiro B, Teixeira FG *et al.* Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue derived stem cells and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. *Stem Cells and Development.* 2016; 25(14):1073-83.
- Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AL. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 2019 Dec 2; 4:22.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411):143-47.

- Rafiq QA. Developing a standardised manufacturing process for the clinical-scale production of human mesenchymal stem cells, PhD Thesis, Loughborough University, UK.
- Ragni E, Banfi F, Barilani M et al. Extracellular vesicle-shuttled mRNA in mesenchymal stem cell communication. *Stem Cells*. 2017; 35(4): 1093-1105.
- Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(3):244-58.
- Rani S, Ryan AE, Griffin MD et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy*. 2015; 23(5):812-23. *Biotehnologija mezenhimskih matičnih celic*
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013; 200(4):373-83.
- Rebolj K, Veber M, Drobnič M, Maličev E. Hematopoietic stem cell and mesenchymal stem cell population size in bone marrow samples depends on patient's age and harvesting technique. *Cytotechnology*. 2018; 70(6):1575-83.
- Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 4:125.
- Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics* 2019 20; 7: 377–388.
- Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics*, 2019 20; 7: 377–388
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2):324-36.
- Schweitzer J. S., Song B. H. T. M., Park T.-Y., et al. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 2020 382, 20: 1926–1932.
- Sekine K., Tsuzuki S., Yasui R., et al. Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells. *Scientific Reports* 2022 10; 1: 1.
- Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2017 16; 2: 115–130.
- Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR et al. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke*. 2016; 47:1817-1824.
- Stubbendorff M, Deuse T, Hua X et al. Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. *Stem Cells Dev* 2013; 22:2619-2629.
- Sugimoto N, Kanda J, Nakamura S, et al. iPLAT1: The first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study. *Blood* 2022 140; 22: 2398–2402.
- Taverna S, Pucci M, and Alessandro R. Extracellular vesicles: small bricks for tissue repair/regeneration. *Annals of Translational Medicine*. 2017; 5(4): 83.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1989; 282, 5391: 1145–1147
- Turhan AG, Hwang JW, Chaker D et al. iPSC-derived organoids as therapeutic models in regenerative medicine and oncology. *Frontiers in Medicine*. 2021 8; 728543.
- US National Institutes of Health,
<https://www.clinicaltrials.gov/>.
- Voges HK, Mills R J, Elliott DA et al. Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential. *Development*. 2017; 143966.
- Voges HK, Mills RJ, Elliott DA, Parton RG, Porrello ER, Hudson JE. Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential. *Development*. 2017; 143966
- Wang X, Huang J, Chen W et al. The updated role of exosomal proteins in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer. *Exp Mol Med*. 2022 54; 1390–1400.
- Wu H, Zhou Y, Tabata Y, Gao J. Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *Journal of Controlled Release*. 2019; 294:102-13.
- Xu J, Wang B, Sun Y et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016; 7(1): 134.
- Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell Stem Cell* 2020 27; 4: 523–531.
- Ylöstalo JH, Bartosh TJ, Coble K et al. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*. 2012; 30(10): 2283-96.

Zhang Y, Huang X, and Y. Yuan. MicroRNA-410 promotes chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through down-regulating Wnt3a. American Journal of Translational Research. 2017; 9(1): 136-45.

Zhang, M., Hu, S., Liu, L. *et al.* Engineered exosomes from different sources for cancer-targeted therapy. Sig Transduct Target Ther. 2023; 8: 124.

Zupan J, Čamernik K, Jeras M *et al.* Mesenchymal stem cells: applications and potential in treatment and diagnosis of musculoskeletal disorders. Farm Vest. 2017; 68: 234-246



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Slovenian Institute for Transfusion Medicine