

Mezenchymalne komórki macierzyste w transplantologii

Jolanta Opiela

*Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Czarakterystyka MSC

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs, mesenchymal stem cells, mesenchymal stromal cells) są multipotencjalnymi, samoodnawiającymi się komórkami niehematopoetycznymi (Banco i in., 2008). Mezenchymą określa się tkankę łączną zarodka, która wywodzi się głównie z mezodermy. Z kolei, mezoderma powstająca w procesie gastrulacji u kręgowców daje początek mięśniom, tkance łącznej, chrząstce, kościom, strunie grzbietowej, krwi, szpikowi kostnemu, limfie, nabłonkowi naczyń krwionośnych i limfatycznych, pokrywającemu jamy ciała, wyścielającemu nerki, moczowody, gonady, przewody płciowe, korę nadnerczy i innym tkankom. Wiele tkanek mezenchymalnych zawiera komórki prekursorowe ukierunkowane na różnicowanie w określonym kierunku, tzw. mezenchymalne komórki prekursorowe, które mogą uczestniczyć w miejscowej regeneracji tkanek, np. prekursorzy osteocytów w kościach. W mezenchymie można także znaleźć komórki, które nie są ukierunkowane na konkretne potomne linie komórkowe; mają one potencjał różnicowania się w różne linie komórkowe, np. komórki kości, mięśni, chrząstki i komórki tłuszczowe. Mezenchymalne komórki macierzyste charakteryzują się, jak inne komórki macierzyste, zdolnością do samoodnawiania, czyli posiadają zdolność wytwarzania komórki potomnej podobnej do komórki macierzystej. Ponadto, pojedyncza komórka posiada zdolność

różnicowania się w wiele linii komórkowych a *in vivo* są zdolne do odtworzenia tkanek, w które mogą się różnicować.

Odkryto wiele źródeł, z których można wyizolować MSCs (tkanka tłuszczowa, galareta Whartona w pępowinie, krew pępowinowa, łożysko, płyn maziowy, migdałki, chrząstka, skóra, cebulka włosa, a nawet krew menstruacyjna), jednak najczęściej do izolacji wykorzystuje się szpik kostny. Szpik kostny, oprócz MSC, zasiedlony jest też przez komórki krwiotwórcze, jednak komórki mezenchymalne wykazują ekspresję określonych markerów powierzchniowych, takich jak CD44, CD105, CD166, CD73, CD90, STRIO-1, a nie wykazują ekspresji CD14, CD34, CD45, dzięki czemu można je odróżnić od komórek hematopoetycznych.

Medycyna regeneracyjna wykorzystuje komórki macierzyste do odtworzenia prawidłowej funkcji tkanki bądź narządu. Przeprowadzone na całym świecie badania niosą obiecujące wyniki, dające nadzieję na leczenie wielu chorób ortopedycznych, kardiologicznych, a nawet leczenie uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego. Również badania prowadzone w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach (w ramach grantu rozwojowego, którego wnioskodawcą jest Fundacja Rozwoju Kardiologii w Zabrze) wykorzystują macierzyste komórki mezenchymalne świni oraz owcy w projekcie, mającym na celu opracowanie nowej protezy zastawki biologicznej serca, tzw. zastawki autologicznej, w oparciu o techniki in-

żynierii tkankowej. Zastawki serca pozyskane od transgenicznych świni, których tkanki wykazują ekspresję ludzkiej 1,2-fukozylotransferazy oraz charakteryzują się obniżonym poziomem epitopu 1,3 α -GAL, poddawane są np. procedurze acellularyzacji z zastosowaniem metod enzymatycznych i chemicznych. Na tak przygotowane zręby łącznotkankowe zastawki nasiewane są komórki mezenchymalne wyizolowane ze szpiku kostnego owcy, zróżnicowane w odpowiednie komórki w hodowli *in vitro*. Komórki MSC w prezentowanych doświadczeniach zostały wybrane jako najbardziej odpowiednie z uwagi na ich właściwości różnicujące oraz immunosupresyjne, co może być wykorzystywane w zapobieganiu reakcji: „przeszczep przeciw gospodarzowi”. Dalsza część pracy szerzej rozwija ww. właściwości prezentowanych komórek.

MSC w ujęciu immunologicznym

Komórki macierzyste posiadają właściwości immunomodulujące i naprawcze. Przez specyficzne interakcje z komórkami odpornościowymi, które uczestniczą zarówno we wrodzonej i nabytej odpowiedzi, MSC poddane działaniu mikrośrodowiska zapalnego mogą ograniczać bądź tłumić odpowiedź układu odpornościowego. Aktualne analizy sugerują, że komórki MSC poprawiają efektywność transplantacji komórek i narządów poprzez zmniejszenie i złagodzenie odrzucenia przeszczepu, co daje możliwość wyeliminowania konieczności podawania przez dłuższy czas konwencjonalnych leków immunosupresyjnych. Transplantacja jest terapią ratującą życie wielu pacjentów z niewydolnością narządową. Rozwój leków immunosupresyjnych umożliwił przeszczepianie narządów, tkanek i komórek dzięki opóźnieniu procesu odrzucenia przeszczepów. Jednak, długotrwałe stosowanie tych leków powoduje negatywne skutki w postaci zwiększonej podatności na infekcje, ryzyka powstania nowotworu, powikłań sercowo-naczyniowych, indukcji *de novo* cukrzycy i niewydolności nerek (López i in., 2006). W związku z tym, konieczny jest rozwój alternatywnych metod leczenia immunosupresyjnego. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że multipotencjalne mezenchymalne komórki podścieliska (MSC), zwane także mezenchymal-

nymi komórkami macierzystymi, mogą stać się alternatywą dla tradycyjnych przeszczepów ze względu na ich zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej. Wprawdzie wstępne wyniki stosowania tych komórek są bardzo obiecujące, odnotowano jednak znaczne różnice w wynikach eksperymentalnych badań przedklinicznych, co sprawia, że wciąż pozostaje wiele pytań o zachowanie MSCs w konkretnych schematach terapeutycznych.

Badania przeprowadzone przez Friedensteina i współpracowników oraz późniejsze prace Caplana i Owena wykazały istnienie subpopulacji multipotencjalnych komórek szpiku kostnego, które odznaczają się zdolnością wspierania hematopoezy (Caplan, 1991; Friedenstein i in., 1966, 1970, 1974; Owen, 1988). Z uwagi na właściwości hematopoetyczne próbowano wykorzystać MSC w celu umożliwienia lub wzmocnienia przeszczepiania hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC). W 1995 r. dokonano autologicznego przeszczepu namnożonych *in vitro* MSCs chorym z hematologicznymi nowotworami złośliwymi, które były w całkowitej remisji. Wykazano, że postępowanie takie jest bezpieczne (Lazarus in., 1995). Bartholomew i in. (2002) jako pierwsi rozszerzyli badania na temat wpływu MSCs na tworzenie i przeszczepianie komórek krwi oraz sposobu, w jaki wpływają one na działanie dojrzałych komórek układu odpornościowego. Autorzy ci wykazali, że MSCs mają działanie immunosupresyjne *in vitro* i *in vivo* (Bartholomew i in., 2002). Z kolei, Di Nicola in. (2002) wykazali, że ogólnie rzecz ujmując czynniki rozpuszczalne są istotne w modulowaniu odporności przez MSC. Ponadto, znaczna część późniejszych badań *in vitro* potwierdziła powyższe doniesienia wykazując, że immunosupresyjna funkcja MSCs polega na zahamowaniu proliferacji komórek T (Aggarwal i Pittenger, 2005; Glennie i in., 2005; Klyushnenkova i in., 2005; Krampera i in., 2003; Potian i in., 2003; Tse i in., 2003) lub modulacji fenotypu (czyli antygenów na powierzchni komórki) (Beyth i in., 2005; Groh i in., 2005; Jiang i in., 2005; Zhang i in., 2009, za English i in., 2010).

Komórki mezenchymalne są obecnie stosowane w próbach klinicznych leczenia choroby Crohna, cukrzycy typu I i stwardnienia rozsianego (www.clinicaltrials.gov) (Ankrum i Karp,

2010). Wstępne wyniki wyglądają zachęcająco, nie wiadomo jednak, w jaki sposób MSCs regulują komórki układu immunologicznego *in vivo* (English i in., 2010).

Odrzucanie przeszczepu i wpływ MSC

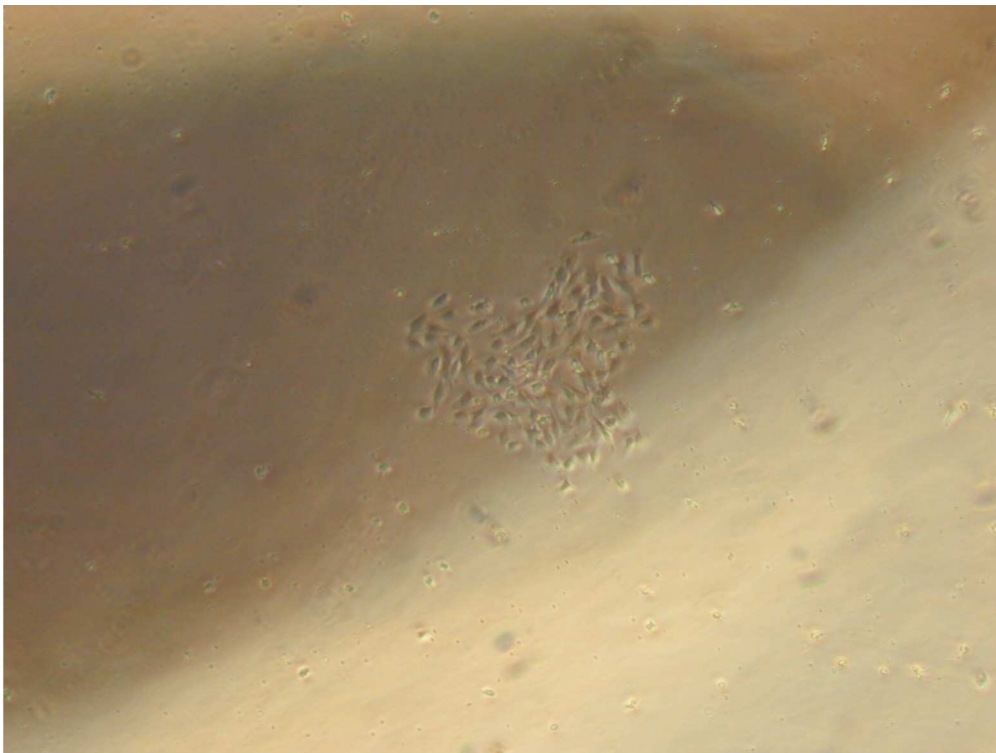
Nadrzędnym celem transplantacji jest nabycie stanu tolerancji lub braku odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie. Jest coraz więcej dowodów na to, że MSCs mogą ułatwić osiągnięcie tego celu. Oprócz ich zdolności do wytwarzania czynników troficznych, MSCs wykazują również silne działanie przeciwzapalne, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W ten sposób mają one zdolność do regulowania działalności i aktywności limfocytów T, limfocytów B, komórek dendrytycznych (DCs), naturalnych zabójców (komórek NKs) i makrofagów (Asari i in., 2009; Nemet i in., 2009; Sheng i in., 2008; Spaggiari i in., 2008; English i in., 2010). Obok tych interakcji na poziomie komórkowym dochodzi do zasiedlania przez MSCs miejsc zapalnych, a następnie aktywacji mechanizmów immunomodulujących. Obserwacja ta sugeruje, że MSCs mają możliwość regulacji odpowiedzi układu odpornościowego w bardzo specyficzny sposób (Ding i in., 2010; Ren i in., 2008). Należy pamiętać, że oprócz pozyskiwania MSC ze szpiku kostnego możliwa jest izolacja tych komórek także z innych tkanek, takich jak: tkanka tłuszczowa, galaretki Whartona i krew pępowinowa (da Meirelles Silva i in., 2006; Kern i in., 2006; Yoo i in., 2009; English i in., 2010). Obecnie badania koncentrują się na MSC szpiku kostnego, jednak zwiększa się liczba doniesień na temat MSCs pochodzących z innych tkanek, które wykazują również właściwości immunosupresyjne. Wciąż jednak znikoma liczba badań porównująca MSC myszy i człowieka wskazuje na mierzalne różnice w regulacyjnym wpływie na komórki układu odpornościowego (Bochev i in., 2008; Hegyi i in., 2010; Ivanova-Todorova i in., 2009; English i in., 2010). Na przykład, MSCs pozyskane z tkanki tłuszczowej miały silniejszy wpływ na zahamowanie syntezy Ig i większe zahamowanie różnicowania prekursorów komórek dendrytycznych (DC) (Bochev i in., 2008; Ivanova-Todorova i in., 2009). Obserwacje te podkreślają znaczenie mechanizmu

działania danej populacji MSCs oraz wskazują na potrzebę bardziej wyczerpującego prowadzenia badań porównawczych.

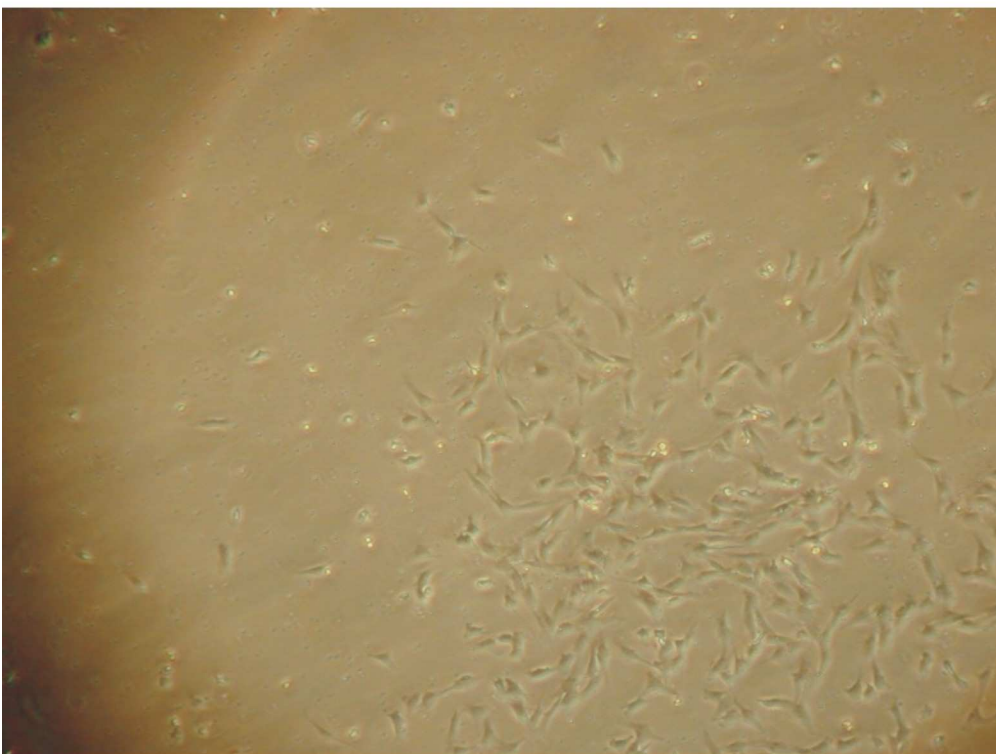
MSCs jako narzędzia terapeutyczne w transplantacji komórek i narządów

Macierzyste komórki mezenchymalne jako narzędzia terapeutyczne w transplantologii mogą pochodzić z trzech źródeł: autologicznych – od biorcy, allogenicznych – od dawcy lub allogenicznych – nie pochodzących ani od biorcy, ani od dawcy. Autologiczne komórki są najbezpieczniejszym rozwiązaniem z uwagi na znikome ryzyko odrzucenia lub wystąpienia reakcji „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (ang. Graft-Versus-Host Disease, GVHD). Jednakże, istnieją okoliczności, w których zdrowe, autologiczne, HLA-dopasowane komórki nie będą dostępne. Dlatego, allogeniczne MSCs stanowiłyby bardzo atrakcyjne źródło komórek do badań klinicznych (English i in., 2010). Oprócz wyboru odpowiedniego źródła MSCs istotne jest również określenie optymalnej liczby komórek i sposobu podania. Dożylne podawanie MSC jest, jak dotąd, użyteczne zarówno w badaniach na ludziach, jak i na zwierzętach. Inną możliwością jest przetoczenie MSCs do organu dawcy przed przeszczepem (English i in., 2010). W mysim modelu cukrzycy MSCs zostały wprowadzone pod torebkę nerki w połączeniu z wysepkami trzustkowymi dawcy, co ułatwiło przyjęcie przeszczepu (Ding i in., 2009). Ta metoda zdaje się pomagać w tworzeniu mikrośrodowiska przeszczepu, w którym MSCs mogłyby mieć działanie immunomodulujące. Potrzebne są jednak dalsze badania w celu wyjaśnienia sposobu zasiedlania MSC przy transplantacji. W dotychczasowych badaniach klinicznych liczba podawanych MSCs wynosiła od $0,4 \times 10^6$ do 10×10^6 /kg masy ciała (Le Blanc i in., 2008; Macmillan i in., 2009). Nie odnotowano wyraźnej zależności dawki MSCs od ilości wlewów – niektórzy pacjenci odpowiadali na jeden wlew, inni dopiero na drugi, podczas gdy jeszcze inni nie odpowiadali na kilkakrotne wlewy (Le Blanc i in., 2008).

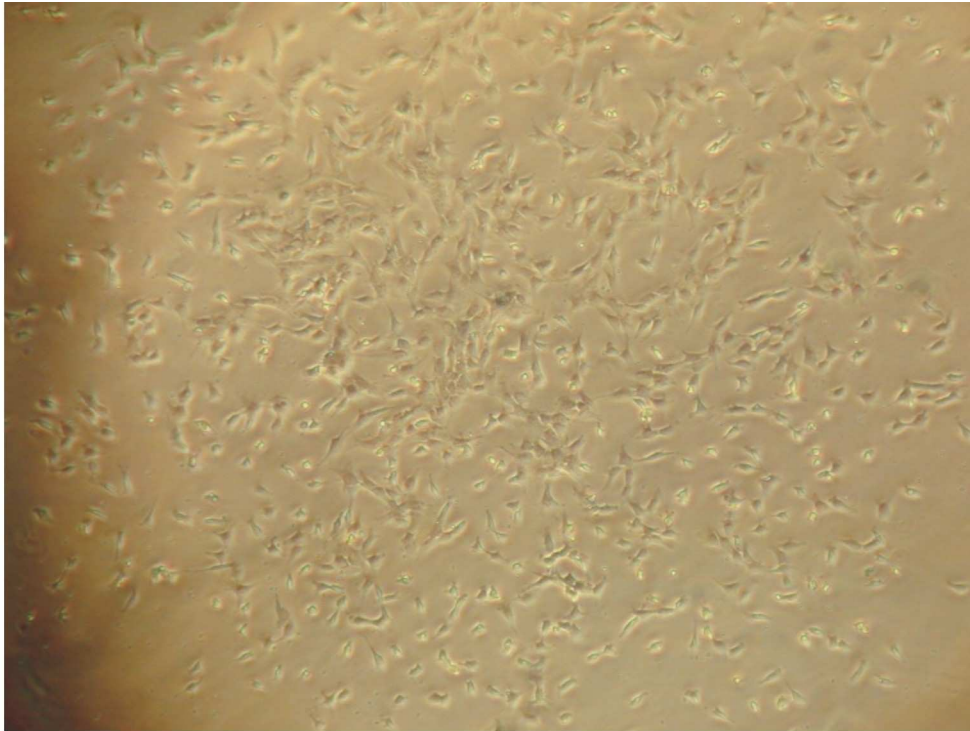
Reakcja typu „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (Graft-Versus-Host Disease, GVHD) to rodzaj fizjologicznej (choć np. w transplantologii hematologicznej często niepożądaney)



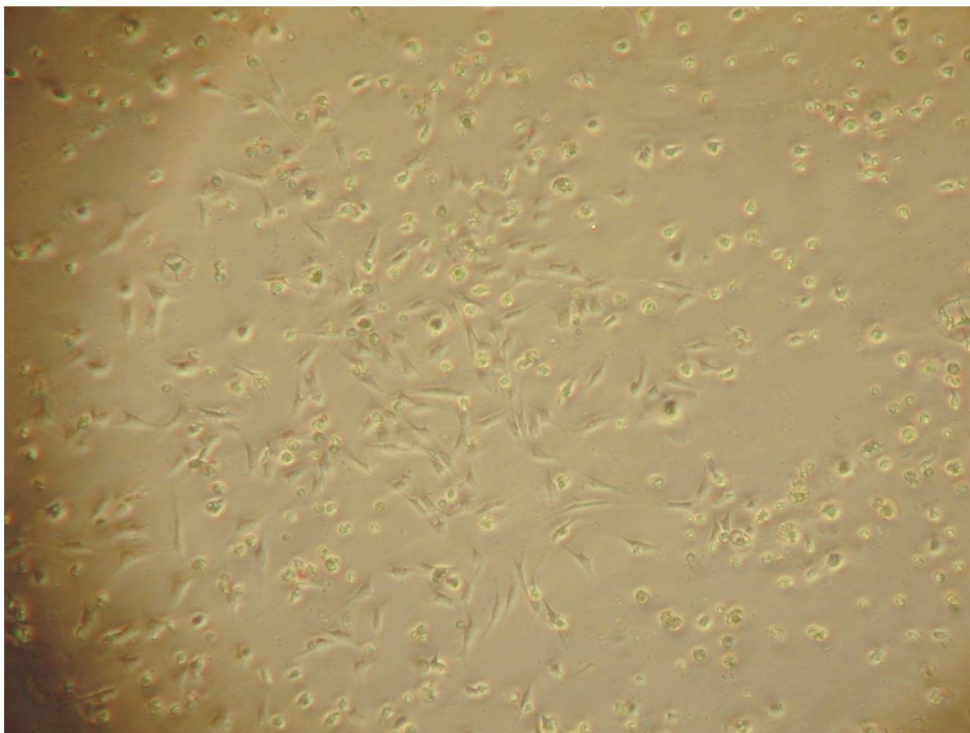
Fot. 1a. Kolonia świńskich MSC w 7 dniu hodowli *in vitro*
Fig. 1a. Colony of porcine MSCs on day 7 of in vitro culture



Fot. 1b. Kolonia świńskich MSC w 7 dniu hodowli *in vitro*
Fig. 1b. Colony of porcine MSCs on day 7 of in vitro culture



Fot. 2. Kolonia świńskich MSCs w 10 dniu hodowli *in vitro*
Fig. 2. Colony of porcine MSCs on day 10 of in vitro culture



Fot. 3. Kolonia MSC (kształt zbliżony do fibroblastów) w otoczeniu komórek hematopoetycznych (mniejsze, okrągłe komórki nie przyklejają się do dna butelki hodowlanej i są sukcesywnie usuwane w trakcie kolejnych zmian pożywki hodowlanej)

Fig. 3. MSC colony (fibroblast-like in shape) surrounded by hematopoietic cells (smaller, round cells do not stick to the bottom of culture bottle and are gradually removed with successive changes of culture medium)

reakcji, zachodzącej w organizmie biorcy pod wpływem wprowadzonych do niego obcych antygenowo limfocytów. Limfocyty T przyjęte od dawcy naciekają (obce dla nich) tkanki gospodarza i doprowadzają do ich niszczenia. Usunięcie zawiesiny limfocytów z materiału przeszczepowego zmniejsza ryzyko GVHD, jednak, nieobecność leukocytów w przeszczepie wzmacnia ryzyko reakcji „gospodarz przeciwko przeszczepowi” i w efekcie odrzucenia przeszczepu (English i in., 2010).

Ciekawe obserwacje odnotowano w próbie klinicznej wykorzystującej MSCs trzeciego źródła jako pierwszą i drugą linię terapii u pacjentów z GVHD i GVHD z jednoczesną opornością na sterydy. Zaobserwowano znaczący statystycznie efekt placebo, tzn. że MSCs nie były bardziej efektywne od placebo (English i in., 2010). Dla przeciwwagi, w innych badaniach prowadzonych u pacjentów z GVHD wątroby odpornej na sterydy i GVHD żołądkowo-jelitowym odnotowano znaczącą poprawę u chorych leczonych MSCs (Mills, 2009). Bardzo istotne jest zatem wyjaśnienie, jak MSCs działają *in vivo*, aby lepiej zrozumieć ich interakcje z istniejącymi terapiami, żeby móc je zastosować w leczeniu klinicznym (English i in., 2010).

Wnioski i perspektywy

Ogólnie rzecz biorąc, zdolność MSCs do hamowania proliferacji komórek T, dojrzewania DC i migracji komórek B, hamowania syntezy Ig i funkcji NK wskazuje, że komórki te mają zdolność do opanowania odpowiedzi immunologicznej. Wydaje się, że MSCs wymagają aktywacji, aby w pełni rozwinąć swój potencjał immunomodulacyjny i że rolę tę pełnią wytwarzane przez różne komórki odpornościowe czynniki, działające na MSCs w celu wywołania zmian i wzbudzenia mediatorów (English i in., 2010). Czy MSC regulują aktywność innych populacji komórek przez kontakt komórka-komórka czy przez specyficzne czynniki rozpuszczalne nie jest jednoznacznie stwierdzone, gdyż istnieją sprzeczne doniesienia na ten temat. Jedno z wyjaśnień zakłada, że wspomniane czynniki drogą chemotaksji kierują komórki układu odpornościowego w bliskie sąsiedztwo MSCs. Kontakt komórka-komórka lub mediato-

ry rozproszone w obrębie mikrośrodowiska mogą następnie zwiększyć tłumienie lub immunomodulację. Jest bardzo prawdopodobne, że taki wymóg rekrutacji istnieje *in vivo*, ale te scenariusze, co jest zrozumiałe, są trudne do powtórzenia poza żywym organizmem. Należy zachować ostrożność podczas próby tłumaczenia zdarzeń klinicznych na podstawie wyników uzyskanych na myszy *in vivo*, ponieważ odnotowano kluczowe różnice w zjawiskach i procesach obserwowanych w MSC myszy i człowieka. Niemniej jednak, modele myszy pozostają niezwykle przydatne jako narzędzia eksperymentalne. Szereg sprzeczności w wynikach badań, prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* na modelach zwierzęcych, może być, jak się zdaje, wyjaśnionych niejednorodnością populacji komórek uznawanych za MSCs (English i in., 2010). Bez wątpienia, konieczny jest jasny i dobrze zdefiniowany opis populacji komórek wykorzystywanych w badaniach, jak również sposób izolacji czystej populacji MSCs.

Teoretycznie MSCs mają potencjał zwiększenia progresji raka, ponieważ mają zdolność generowania środowiska, w którym odpowiedź immunologiczna jest stłumiona (w tym odpowiedź immunologiczna na guza). Chociaż namnażają się energicznie *in vitro*, niewiele jest danych na temat tempa ich podziałów *in vivo*. Zasiedlenie podawanych MSCs również wydaje się być ograniczone. Z drugiej strony, wydzielają one wiele czynników wzrostu, cytokin i metaloproteinaz, w tym VEGF i IL-6, które potencjalnie mogłyby przyspieszać wzrost guza. VEGF jest znany jako czynnik indukujący angiogenezę, a tym samym stymuluje wzrost guza i tworzenie przerzutów (Kogler i in., 2005; English i in., 2010). Dalsze dowody wskazują, że MSCs są rekrutowane do miejsc nowotworzenia, gdzie integrują się ze zrębem nowotworu (Spaetha i in., 2009). W związku z tym badania nad potencjalnym negatywnym wpływem infuzji MSCs muszą być kontynuowane.

Jak wspomniano uprzednio, w modelach *in vivo* wykazano, że MSCs mogą być używane w połączeniu z szeregiem immunosupresyjnych leków obecnie stosowanych klinicznie. Dane, które wyłaniają się z pierwszych badań klinicznych z użyciem MSCs w transplantologii dostarczają ważnych i cennych informacji. Aby w pełni wykorzystać potencjał MSCs, musi na-

stąpić optymalizacja realizowanego schematu zarówno w odniesieniu do liczby komórek, jak i sposobu ich podawania. Złożoność potencjalnych interakcji między MSC i różnorodnymi mediatorami odpowiedzi immunologicznej jasno

wskazuje na znaczenie dodatkowych badań *in vivo* w zakresie modeli doświadczalnych w celu ustalenia roli MSCs i wyjaśnienia mechanizmów immunoregulacji w różnych sytuacjach klinicznych (English i in., 2010).

Wybrane, najważniejsze pozycje literatury:

Aggarwal S., Pittenger M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105: 1815–1822.

Asari S., Itakura S., Ferreri K., Liu C.P., Kuroda Y., Kandeel F., Mullen Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp. Hematol.*, 37: 604–615.

Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R. i in. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hematol.*, 30: 42–48.

Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2: 313–319.

English K., French A., Wood K.J. (2010). Mesenchymal stromal cells: Facilitators of successful Transplantation? *Cell Stem Cell*, 7: 431–442.

Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 3: 393–403.

Ivanova-Todorova E., Bochev I., Mourdjeva M., Dimitrov R., Bukarev D., Kyurkchiev S., Tivchev P.,

Altunkova I., Kyurkchiev D.S. (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.*, 126: 37–42.

Le Blanc K., Rasmuson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363: 1439–1441.

Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M. i in. (2008). Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Lancet*, 371: 1579–1586.

López M.M., Valenzuela J.E., Alvarez F.C., López-Alvarez M.R., Cecilia G.S., Paricio P.P. (2006). Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl. Immunol.*, 17: 31–35.

Yoo K.H., Jang I.K., Lee M.W., Kim H.E., Yang M.S., Eom Y., Lee J.E., Kim Y.J., Yang S.K., Jung H.L. i in. (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell. Immunol.*, 259: 150–156.

MESENCHYMAL STEM CELLS IN TRANSPLANTATION

Summary

The article briefly presents the biological and functional properties of MSCs isolated and expanded *ex vivo* from bone marrow (BM) in view of their use in animal models of solid organ transplantation to facilitate engraftment.