

# Razotkrivanje mita: Matične ćelije - Panaceja\* ili ne?

Milica Kovačević Filipović

Katedra za patološku fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu



**Prof. dr vet. sci. Milica Kovačević Filipović**, je zaposlena na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Katedra za patološku fiziologiju. Glavne oblasti istraživanja su joj biologija matičnih ćelija i odgovor akutne faze. Takođe radi na razvoju kliničke patologije domaćih životinja. Postdoktorske studije u trajanju od 18 meseci je obavila na Institutu za hemiju prirodnih supstanci u Francuskom nacionalnom istraživačkom centru i u Francuskom centru za krv.

\* *Lek za sve bolesti*

## Uvod

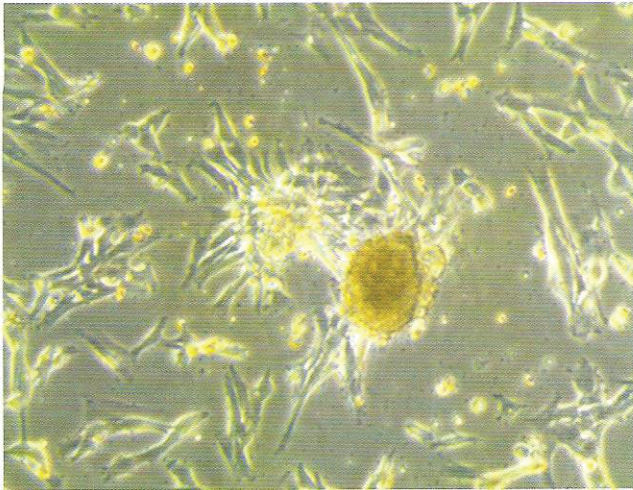
Svedoci smo često velikog pritiska štampe da objavi senzacionalna otkrića koja će čovečanstvo ili uvesti u propast, ili ga spasiti od svakojake muke, bolesti i gladi. Matične ćelije su jedna od tema koja se na taj način iskorišćava. Matične ćelije jesu same po sebi senzacionalne, jer se nastanak života i njegovo održavanje bazira na neprestanom radu ovih ćelija, ali sa druge strane, život je sam po sebi vrhunska i nedokučiva osobina koju svi prolazno posedujemo. Mislim da je u bazičnoj nauci matična ćelija senzacionalna zato što je omogućila istraživačima da shvate da donekle, in vitro, mogu da upravljaju onim što je evolucija izvajala tokom milijardi godina stvaranja, a laicima ulila nadu da se uništenom tkivu može vratiti normalna, fiziološka struktura i funkcija. Između te dve vizije leži realan problem da medicina i biotehnologija treba da izvedu robusnu zamisao oponašanja prirode i stvaranja žive materije.

Kada se spominje terapija matičnim ćelijama, u zavisnosti od konteksta, misli se ili na matične ćelije hematopoeze

(MČH) ili mezenhimalne matične ćelije (MMĆ), dok se koncept primene embrionalnih matičnih ćelija, koji se desetak godina činio kao obećavajući, polako napušta. Na horizontu se pojavljuje i mogućnost primene indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, ali će u narednom tekstu će biti ispričana priča o MČH i MMĆ koje su trenutni nosioci najvećeg broja kliničkih ispitivanja u medicini.

## Matične ćelije – Indikacije za primenu u veterinarskoj medicini

Hronična bolest, ili akutna bolest koja ne ugrožava život, ali se ne može izlečiti konvencionalnom vrstom terapije, frustrirajuća je za vlasnike životinja i izvesno, kao i u humanoj medicini, predstavlja metu alteranitivnih vrsta terapija. Poslednjih deset godina je orkestriranim i/ili spontanim radom medija i drugih sredstava javnog informisanja u zapadnim državama, pogotovo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), praktično stvoreno tržište koje može da prihvati ponudu različitih kompanija koje se bave jednostavnim biznisom – umnožavanjem ćelija koje nude kao terapiju za bolesti različite etiologije – od osteoartitisa do šećerne bolesti i hronične insuficijencije bubrega. Naime, od malog broja ćelija, najčešće izolovanih iz potkožnog masnog tkiva, ili ređe iz kostne srži, in vitro se posle dve tri nedelje kultivacije u medijumu bogatom hranljivim materijama može dobiti više miliona ćelija (Slika 1) za koje mnogi istraživači tvrde da imaju lekovita svojstva i koje se odevaju u ruho zvučnog naziva MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE (MMĆ), formula sa kojom zadobijanje poverenja vlasnika životinja i uspeh terapije zvuče čarobno. O kojim je matičnim ćelijama reč? Da li znamo po čemu se matične ćelije razlikuju od drugih ćelija našeg organizma? Koje sve vrste matičnih ćelija postoje i po čemu se razlikuju međusobno? I najvažnije pitanje od svih pitanja u veterinarskoj medicini – da li imamo znanje i tehničke mogućnosti da dijagnostikujemo bolest koju želimo da lečimo. Sve to krajnji korisnik ne zna, ali ni većina veterinara koji bi navodno tu terapiju trebalo da primene. Neki veterinari smatraju da uopšte nije važno šta lečimo i na koji način, važno je da ima efekta! To je naravno skandalozna izjava koja se ne može ničim opravdati.



**Slika 1.** Adherentne ćelije u kulturi slikane pod invertnim mikroskopom. Fibroblastoidni tip ćelija izolovan iz potkožnog masnog tkiva psa je jedinstven za sve adherentne ćelije mezodermalnog porekla, kao i za mezenhimalne matične ćelije. (Ćelije slikane u Laboratoriji za ćelijsku kulturu, Katedra za patološku fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu).

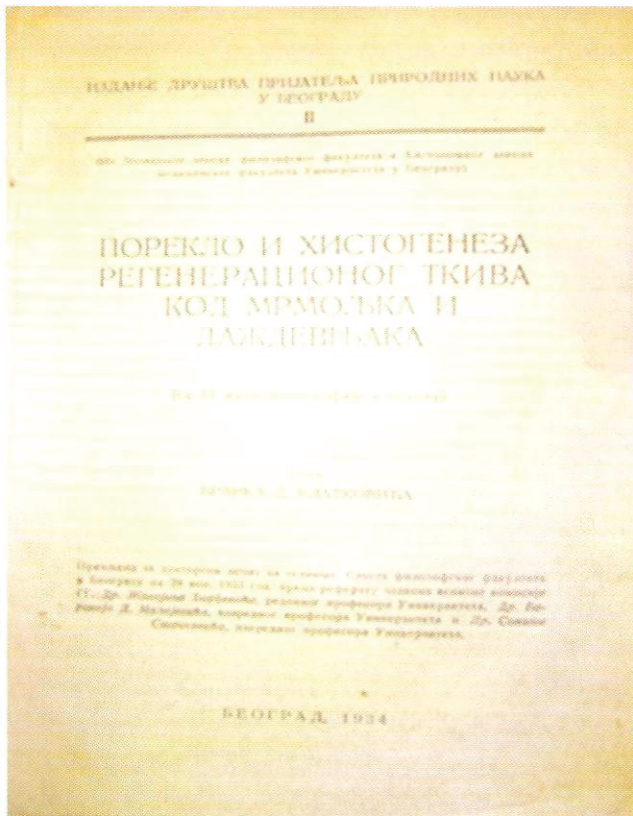
Nepoznavanje problematike indikacija za terapiju MMĆ nije ničija greška zato što i u svetskim razmerama, a i sa aspekta humane medicine, nema jasnih preporuka za njihovu primenu, jednostavno zato što još uvek ne postoji dovoljno podataka da bi se one dale. Takođe, na većinu od drugih gore postavljenih pitanja nije dat jasan odgovor, odnosno nema dovoljno sakupljenih relevantnih podataka na osnovu kojih bi se donele preporuke i suštinski ili principijelno jedinstveni protokoli koji bi mogli da se slede i posluže da se ovaj vid terapije koja je u fazi eksperimentalnih istraživanja i dalje unapređuje. U ovom radu će biti prikazan jedan od retkih radova koji je objavljen u bazi podataka Pubmed, koji predstavlja bolji primer naučnog i stručnog pristupa istraživanjima vezanim za primenu MMĆ u terapiji osteoartritisa kod pasa, što je svakako jedan od trenutno najviše propagiranih načina primene MMĆ u veterinarskoj medicini.

### Glorifikacija matičnih ćelija – marketing na delu

Kako je došlo do stvaranja mitskog odnosa i odnosa punog strahopoštovanja jednog dela javnog i stručnog mnjenja prema zapravo potpuno neispitanom načinu terapije? Možemo pretpostaviti da su u pitanju različiti faktori od kojih su neki pobrojani na početku ovog teksta: sa jedne strane, oboljenje za koje konvencionalni metod terapije ne nudi adekvatno rešenje i osećaj bespomoćnosti pacijenta (ukoliko je pacijent čovek) ili vlasnika životinje, a sa druge strane, dobra reklama u koju su uključeni industrija i

profit. Ove činjenice ne isključuju mogućnost da se MMĆ mogu primeniti u terapijske svrhe, ali ukazuju na to da se prema ovom vidu terapije treba postaviti KRITIČKI.

Matične ćelije su popularnost u javnosti svakako stekle zahvaljujući odavno poznatoj činjenici da niže vrste kičmenjaka mogu da regenerišu čitave udove. Više decenija se smatralo da se ta regeneracija dešava zahvaljujući aktivaciji matičnih ćelija i da se otkrivanjem mehanizama koji omogućavaju tu regeneraciju kod nižih vrsta može na neki način stimulisati i kod viših kičmenjaka, odnosno kućnih ljubimaca i čoveka. Ovde bih želela da naglasim da se na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, problematika regeneracije udova nižih kičmenjaka proučavala još između dva svetska rata. Naime, profesor Branko Vlatković, koji je i osnivač Katedre za histologiju i embriologiju, 1934. godine je odbranio doktorsku disertaciju pod nazivom Poreklo i histogeneza regeneracionog tkiva mrmoljka i daždvenjaka (Slika 2), izdanje Društva prijatelja prirodnih nauka (pregledni rad: Radovanović i sar., 2014). On je zapazio je da su za regeneraciju amputiranih ekstremiteta kod ovih životinja odgovorne ćelije slične fibrocitima sisara. Pokazao je da su ove ćelije, koje je nazvao histiocitoblasti, smeštene u krznu, perineuriumu, perihondrijumu, periostu i perivaskularno, mogu da migriraju, intenzivno se dele, nakupljaju i obrazuju blastem iz koga će se diferencirati krvni sudovi, mišići, nervi, vezivo i skeletni delovi (pregledni rad: Radovanović i sar., 2014). Ta rana istraživanja su mogla uglavnom da se oslone na zapažanje pojedinih histoloških fenomena, dok je molekularni nivo velike regenerativne sposobnosti ćelija udova nižih kičmenjaka tek skorije otkriven. U međuvremenu je talas proučavanja matičnih ćelija zasenio sve druge tipove istraživanja i matične ćelije su unapred proglašene za glavne aktere regeneracije udova posle amputacije. Tek je poslednjih godina otkriveno da kod nižih kičmenjaka sve ćelije udova (niže od ramenog zgloba) zadržavaju mogućnost dediferencijacije, proliferacije i ponovne diferencijacije u isti tip ćelija. Kako ni niži kičmenjaci ne mogu regenerisati sve delove tela, može se zaključiti da je osobina ćelija koje zadržavaju mogućnost dediferencijacije direktno povezana sa njihovim embrionalnim poreklom i naravno stepenom evolutivnog razvoja pojedinih vrsta životinja. Osim toga, veliki regenerativni kapacitet imaju fetusni u ranom stadijumu razvoja, kod kojih je pokazano da oštećenja kože zarastaju bez ožiljka, što je kod fetusa u kasnoj gestaciji i kod odraslih osoba nemoguće (Namazi i sar., 2010). To sve ukazuje na to da je dobar regenerativni



**Slika 2.** Doktorska disertacija profesora Branka Vlatkovića, osnivača Katedre za histologiju i embriologiju Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

kapacitet viših kičmenjaka, verovatno zbog prevencije nastanka tumora, ograničen samo na pojedina tkiva (kao što je koštano i hematopoetsko tkivo) i njihovu očuvanost.

### **Matične ćelije hematopoeze – istorija kliničke primene duga 56 godina**

Drugi razlog za formiranje mita o matičnim ćelijama je činjenica da se u humanoj medicini od 1958. godine u terapiji različitih bolesti hematopoetskog sistema koriste **MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE**. Smatra se da su te 1958. godine, četiri fizičara ozračena posle nesreće u Vinči letalnim dozama jonizujućeg zračenja, preživela zahvaljujući transplantaciji kostne srži izvedenoj u Francuskoj (Jansen, 2005). Te četiri transplantacije se smatraju prvim uspešnim transplantacijama MČH od nesrodnih davalaca. MČH su se do pre 15 godina prikupljale iz kostne srži, pa se izraz transplantacija kostne srži zapravo odnosio na transplantaciju MČH. Danas se skoro sve transplantacije MČH obavljaju posle njihovog izdvajanja iz periferne krvi kod pacijanata kod kojih su prethodnim kondicioniranjem uz pomoć parenteralne aplikacije faktora stimulacije granulocitnih kolonija

(G-CSF – Granulocyte Colony Stimulating Factor), MČH mobilisane iz kostne srži u perifernu krv. Transplantacija MČH može biti autologa, a neke od indikacija su multipli mijelom, non-Hodžkinsov limfom i različiti solidni tumori, kod kojih je cilj transplantacije obnova hematopoeze posle hemoterapije ili zračenja. Drugi vid terapije je alogena transplantacija MČH od srodnih davalaca, i neke od indikacija su obnova hematopoeze posle terapije teških leukemija ili uspostavljanje hematopoeze kod aplastične anemije ili imunodefijencija. Jedan od efekata alogene transplantacije je graft versus leukemia efekat, kada T limfociti, nastali diferencijacijom ćelija kalema, deluju citotoksično na ćelije tumora. Autologa transplantacija nema taj efekat. Iako su psi bili prvi model velike životinje na kojima je u pretkliničkim istraživanjima rađena transplantacija MČH, tek su u 2012. i 2014. godini objavljena dva rada u kojima se ova terapija danas predlaže i za same pse (pregledni rad: Kovačević Filipović, 2014). Naravno, ovaj vid personalizovane medicine je skup i zaista teško dostupan za terapiju kućnih ljubimaca. Takođe se može postaviti pitanje koliko je ovaj vid terapije efikasan? Prema statistici objavljenoj 2013. godine od strane udruženja CIBMRT (Center for International Blood and Marrow Transplant) od 100% pacijenata sa nekim oboljenjem hematopoetskog sistema zbog kojeg im je u terapiju uključena transplantacija MČH, oko 60% pacijenata preživi jednu godinu posle transplantacije (<http://www.cibmtr.org>). Ostali pacijenti ne prežive, ali treba imati na umu da se u svim ovim slučajevima radi o teškim mijeloproliferativnim oboljenjima ili aplazijama kostne srži, zbog kojih je život pacijenata akutno ugrožen. Ukupno se u svetu izvede oko 60.000 autologih i alogenih transplantacija MČH godišnje. Svi ovi podaci su proistekli iz pedestogodišnjeg iskustva u ćelijskoj terapiji i govore da primena matičnih ćelija, bez obzira na sam naziv **MATIČNE ĆELIJE**, iako nekad može da bude važna, nije apsolutni lek za sve.

### **Mezenhimalne matične ćelije – kako su ušle u istoriju ?**

Sada se vraćamo na **MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE** koje su interesantne za primenu na životinjama. Naziv mezenhimalne matične ćelije je sam po sebi zbunjujuć zato što mezenhim ne postoji kod odraslih organizama, i poslednji izvor mezenhimalnog, ili mezenhinskog tkiva, je vezivno tkivo pupčane vrpce. Mezenhim je vezivno tkivo embriona i fetusa. Odrasli organizmi ne poseduju mezenhim, pa ni mezenhimalne matične ćelije. Ovaj

termin je skovao Arnold Kaplan (Arnold Caplan) koji je dugo radio na definisanju potencijala za diferencijaciju udova pilećih embriona građenih od mezehima. Posle dužeg niza eksperimenata, koje je zapravo izveo njegov student doktorand, došlo se do zaključka da se u udovima pilećih embriona nalaze posebne ćelije progenitori za osteoblaste i posebne za hondrocite, a da te dve ćelijske linije imaju zajedničku ćeliju prethodnicu koju je Kaplan nazvao mezenhimalna matična ćelija (1991). Odmah po brendiranju ćelija koje se mogu umnožavati u kulturi, u zavisnosti od prisutnih biološki aktivnih molekula i usmeriti u diferencijaciju ka različitim ćelijskim tipovima, Kaplan je otvorio firmu Osiris Therapeutics (1992) koja se bavi proučavanjem ovih ćelija u cilju terapijske primene. Značajno ranije je već bilo pokazano da ćelije izolovane iz kostne srži odraslih glodara imaju potencijal da se diferencijuju u osteoblaste i hondrocite (Friedenstein i Kuraselova., 1971), te je Kaplan imao dobru osnovu da sve ćelije koje se na određeni način ponašaju u kulturi klasifikuje u MMĆ. Posle rada Zuk i sar, (2001) subkutano masno tkivo je postalo omiljeni i lako dostupni izvor ćelija koje imaju karakteristike veoma slične MMĆ izolovanim iz kostne srži, a 2006. godine je Dominići (Dominici) sa saradnicima, ispred Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju, dao preporuke koje kriterijume treba da ispunjava ćelijska populacija da bi se ćelije mogle klasifikovati kao MMĆ. Od tada zaista nastaje ekspanzija radova koji plasiraju MMĆ u okvir regeneracije svih mogućih tkiva i oboljenja. Jedan od snažnih zamajaca ispitivanja MMĆ iz različitih tkiva odraslih organizama je bio rad na izolaciji embrionalnih matičnih ćelija sa početka ovog veka i prepoznavanje, kako etičkih, tako i medicinskih razloga (stvaranje teratoma kod priomaoca) zbog kojih primena embrionalnih matičnih ćelija u kliničkim ispitivanjima nije prisutna. Veliki broj objavljenih radova koji se bave ispitivanjem MMĆ in vitro sada čini da je naučna javnost daleko bolje upoznata sa mogućnostima manipulacije ćelijama in vitro, nego sa njihovim realnim in vivo potencijalima.

### **Mezenhimalne matične ćelije – primer dobre kliničke studije kod pasa**

U veterinarskoj medicini, pogotovu u zapadnim zemljama, primena MMĆ je dosta intenzivna, ali na prvom mestu zato što zakonska regulativa ne postoji, a profit je interesantan. Takođe, koliko je meni poznato, Društvo za regenerativnu

terapiju u veterini verovatno ne postoji, a vlasnici koji imaju novca, a vezani su za svoje ljubimce, pokušavaju da učine sve što tržište nudi da im pomogne. U ovom tekstu neće biti reči o konjima kod kojih su indikacije za terapiju MMĆ dosta jasne, odnosno lako prepoznatljive u vidu sportskih povreda. Kada govorimo o kućnim ljubimcima idealna meta za ćelijsku terapiju, odnosno terapiju MMĆ je zglob pasa. Svaki peti pas ima neki oblik osteoartritisisa. Osteoartritis ne ugrožava život, nije akutna bolest, pa čak iako ne dođe do poboljšanja posle terapije, ni vlasnik, ni veterinar se ne mogu i ne moraju osećati loše, odnosno, osećaju se dobro jer su primenili najnovije rešenje proklamovano da je veoma efikasno u terapiji. Veterinar može dosta bezbedno aplikovati ćelije intraartikularno, jer izbegava sistemsku cirkulaciju. Naime, pokazano je da je od devet pasa kojima su MMĆ aplikovane intravenski, jedan pas dobio klinički vidljivu emboliju pluća i još četiri su imala histološke promene na plućima koje su ukazivale na edem i hemoragiju (Kang i Park, 2014).

Najčešće indikacije za terapiju su osteoartritis koji nastaju kod displazije kuka i lakta. To su ujedno i najčešći etiološki jasno dijagnostikovani osteoartritis. Druge indikacije kod spontano nastalih osteoartritisisa (za razliku od eksperimentalnih) još uvek nisu definisane, osim što se uopšteno govori o osteoartritisima. Jedan deo objavljenih studija finansiraju kompanije koje i prodaju uslugu deponovanja i razmnožavanja matičnih ćelija, te su njihovi rezultati pod znakom pitanja jer imaju konflikt interesa. Takve su dve studije objavljene 2007. godine i 2008. godine (Black i sar, 2007 i 2008), u kojima je posle jednokratne aplikacije autologih MMĆ izolovanih iz masnog tkiva na osnovu ocene hromosti, bola i pokretljivosti zgloba prema definisanim numeričkim skalama, objavljeno da je usvim slučajevima, do 180 dana od terapije, došlo do kliničkog poboljšanja stanja životinja. Od malog broja radova u kojima autori tvrde da nemaju konflikt interesa, nijedna ne prijavljuje potpuno ozdravljenje kod životinja, a veoma mali broj studija jasno kvantifikuje rezultate terapije. Jedna od tih studija će ovde biti detaljnije predstavljena jer smatram da odražava efekte aplikacije MMĆ dosta realno iako mnoge informacije nisu adekvatno prikazane. Naime, radi se o studiji Vilara i saradnika objavljenoj 2013 godine. Oni su takođe aplikovali MMĆ izolovane iz masnog tkiva u koksofemoralni zglob osam pasa starosti od 4 do 8 godina i sa stepenom displazije D i E prema kriterijumima Međunarodne kinološke federacije. Nije navedeno da li su oba zgloba promenjena i terapisirana, ili samo jedan. MMĆ su ubrizgane u zapremini od 4 mL

zajedno sa plazmom bogatom trombocitima dobijenom od iste životinje. Tok bolesti je praćen na osnovu merenja maksimalne snage oslonca i vertikalnog impulsa (distribucija sile oslonca kroz vreme) koji nastaju prilikom oslanjanja na nogu, a na aparatu koji digitalno meri ove veličine (force platform). Najbolji izmereni efekat je bio kada se maksimalna snaga oslonca sa 43% povećala na 53%, a distribucija sile oslonca sa 12% povećala na 15% do 180 dana posle terapije (Vilar i sar., 2013). Autori smatraju da su ti rezultati ohrabrujući i da poboljšavaju kvalitet života pacijenta sa diplazijom kuka.

Zaključak ovog kratkog kritičkog osvrta na terapiju matičnim ćelijama je sledeći: a) mora da postoji naučna zasnovanost polazne hipoteze i naučne metode rada, b) eksperimenti ili kliničke studije moraju da se sprovedu u relevantnim institucijama koje imaju adekvatan stručni i naučni kadar, c) mora postojati saglasnost i potpuna obaveštenost vlasnika o terapiji koja se preduzima, d) od izuzetnog je značaja prikazivanje svih neželjenih efekata terapije, e) mora postojati stručna evaluacija terapijskih efekata i f) rezultati terapije se moraju predstavljati širokoj naučnoj zajednici kroz razne oblike saopštavanja i stručnoj zajednici se mora omogućiti da zauzima kritički stav u odnosu na ovu vrstu terapije.

**Zahvalnica: Ovaj rad je napisan u okviru projekta OI 175061 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.**

#### Literatura:

1. Black LL, Gaynor J, Adams C i sar., 2008, Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*, 9, 192-200.
2. Black LL, Gaynor J, Gahring D i sar., 2007, Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*, 8, 272-84.
3. Caplan AI, 1991, Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopedic Research*, 9, 641-50.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I i sar., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.

5. Friedenstein A, Kuralesova AI., 1971, Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*, 12, 99-108.
6. Jansen J, 2005, The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathé. *Transfusion Medicine Reviews*, 19, 246-248.
7. Kang MH, Park HM., 2014, Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. *Acta Vet Scandinavica*, 56, 16-24
8. Kovačević Filipović M., 2014, The blood is rich in different types of mesoderm derived stem and progenitor cells. *Acta Veterinaria Beograd*, 64, 156-178.
9. Namazi MR, Fallahzadeh MK, Schwartz RA, 2011, Strategies for prevention of scars: what can we learn from fetal skin? *International Journal of Dermatology*, 50, 85-93.
10. Vilar JM, Morales M, Santana A i sar., 2013, Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.*, 9, 131-137
11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H i sar., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7, 211-228.