

MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE: UPORABA IN POTENCIAL ZA ZDRAVLJENJE TER DIAGNOSTIKO MIŠIČNO- SKELETNIH BOLEZNIH

MESENCHYMAL STEM CELLS: APPLICATIONS AND POTENTIAL IN TREATMENT AND DIAGNOSIS OF MUSCULOSKELETAL DISORDERS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.¹
Asist. Klemen Čamernik, mag. farm.¹
Izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.¹
Dr. Ariana Barlič, univ. dipl. biolog²
Izr. prof. dr. Matej Drobnič, dr. med.,
spec. ortopedske kirurgije³
Prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec.
med. biokem.¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² EDUCELL podjetje za celično biologijo, d. o. o.,
Prevale 9, 1236 Trzin

³ Univerzitetni klinični center,
Ortopedska klinika Ljubljana,
Zaloška cesta 9, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: janja.marc@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Mezenhimske matične celice (MSC) so redka in heterogena populacija multipotentnih predhodnikov, prisotnih v številnih tkivih tudi pri odraslem človeku. Pomembne so zaradi svojih imunosupresivnih lastnosti in sposobnosti regeneracije tkiv, kot so kost, hrustanec in skeletne mišice. Zato predstavljajo velik potencial za zdravljenje bolezni in poškodb mišično-skeletnega tkiva. Na tem področju so najbolj raziskane MSC iz kostnega tkiva, skeletnih mišic in sklepne ovojnice. Kljub napredku pri njihovem odkrivanju in klinični uporabi pa še vedno slabo poznamo spremembe v MSC in/ali njihovem mikrookolju, ki bi lahko bile vzrok mišično-skeletnim boleznim, kot so osteoporoza, osteoartrza in sarkopenija. Posledično je potencial MSC v diagnostiki teh patoloških stanj še neizkoriščen. Največje ovire pri napredku na tem področju so preohlapna definicija MSC, njihova tkivna heterogenost ter pomanjkanje specifičnih označevalcev. V prispevku podajamo pregled trenutnega poznavanja vloge MSC v mišično-skeletnem sistemu, njihove uporabe v regenerativni medicini ter njihovega potenciala za diagnostiko bolezni tega pomembnega telesnega sistema.

KLJUČNE BESEDE:

diagnostika, imunosupresija, mezenhimske matične celice (MSC), mišično-skeletni sistem, regeneracija tkiv.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) present a rare and heterogeneous population of multipotent progenitors ubiquitously present in different tissues including those of adults. Due to their immunosuppressive capabilities and potential to regenerate various connective tissues such as bone, cartilage and skeletal muscles, they possess a massive potential for the treatment of various diseases and injuries of musculoskeletal tissues. Within the musculoskeletal system, most well recognized are those from bone tissue, skeletal muscles and joint membrane. Despite the vast progress in their identification and clinical use, changes within MSCs and/or their microenvironment that could potentially initiate musculoskeletal diseases, such as osteoporosis, osteoarthritis and sarcopenia, are still poorly understood. Due to this fact, the potential of MSCs in diagnosing these

conditions is still largely unexploited. The major barriers preventing the progress in this field are loose definition of MSCs, their tissue heterogeneity and lack of specific markers. Here we provide an overview of current knowledge on the role of MSCs in musculoskeletal system, their use in regenerative medicine and their potential in diagnosing disorders of this important body system.

KEY WORDS:

diagnostics, immunosuppression, mesenchymal stem cells (MSCs), musculoskeletal system, tissue regeneration

1 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE V MIŠIČNO-SKELETNEM SISTEMU

Celice, ki sestavljajo naša tkiva in organe, odmirajo vsak dan, zato jih mora organizem nadomestiti. Proces regeneracije tkiv pri odraslih osebah je v fizioloških in patoloških pogojih neposreden rezultat aktivnosti t. i. matičnih celic. Matične celice so široka skupina neusmerjenih in nediferenciranih celic z izjemno sposobnostjo diferenciacije oz. pretvorbe v različne specializirane tkivne celice, tako v prenatalnem kot tudi v postnatalnem obdobju. Glede na izvor jih delimo na dve veliki skupini: embrionalne, ki se nahajajo v blastocisti razvijajočega se zarodka, ter postnatalne (somatske), ki se nahajajo v številnih tkivih odraslih organizmov. V prenatalnem obdobju nastanejo vsa naša tkiva in organi iz matičnih celic v procesu razvoja organov (ontogeneze) iz treh zarodnih plasti (slika 1). Mezenhimske matične/stromalne/progenitorske celice (MSC, mesenchymal stem/stromal/progenitor cells) izvirajo iz mezodermalne zarodne plasti, iz katere se med embrionalnim razvojem razvijejo kostno tkivo, hrustanec, mišice, maščoba in druga vezivna tkiva. Ti mezenhimski predhodniki pa se ohranijo tudi po rojstvu, in sicer v številnih tkivih, v katerih se nahajajo v posebnih anatomskih strukturah, t. i. nišah, v mirujočem, nediferenciranem stanju s počasnim mehanizmom samoobnavljanja. V skeletno-mišičnem sistemu so najbolj raziskane MSC iz kostnega tkiva, sinovijske (sklepne) ovojnice in mišic. Čeprav imajo določene skupne značilnosti (preglednica 1), pa se vedno bolj uveljavlja koncept tkivno specifičnih MSC, ki se med seboj razlikujejo po določenih lastnostih in molekularnih označevalcih (1). Po eni od teorij naj bi bile MSC pravzaprav periciti, torej celice, ki se nahajajo na zunanji strani žilnih

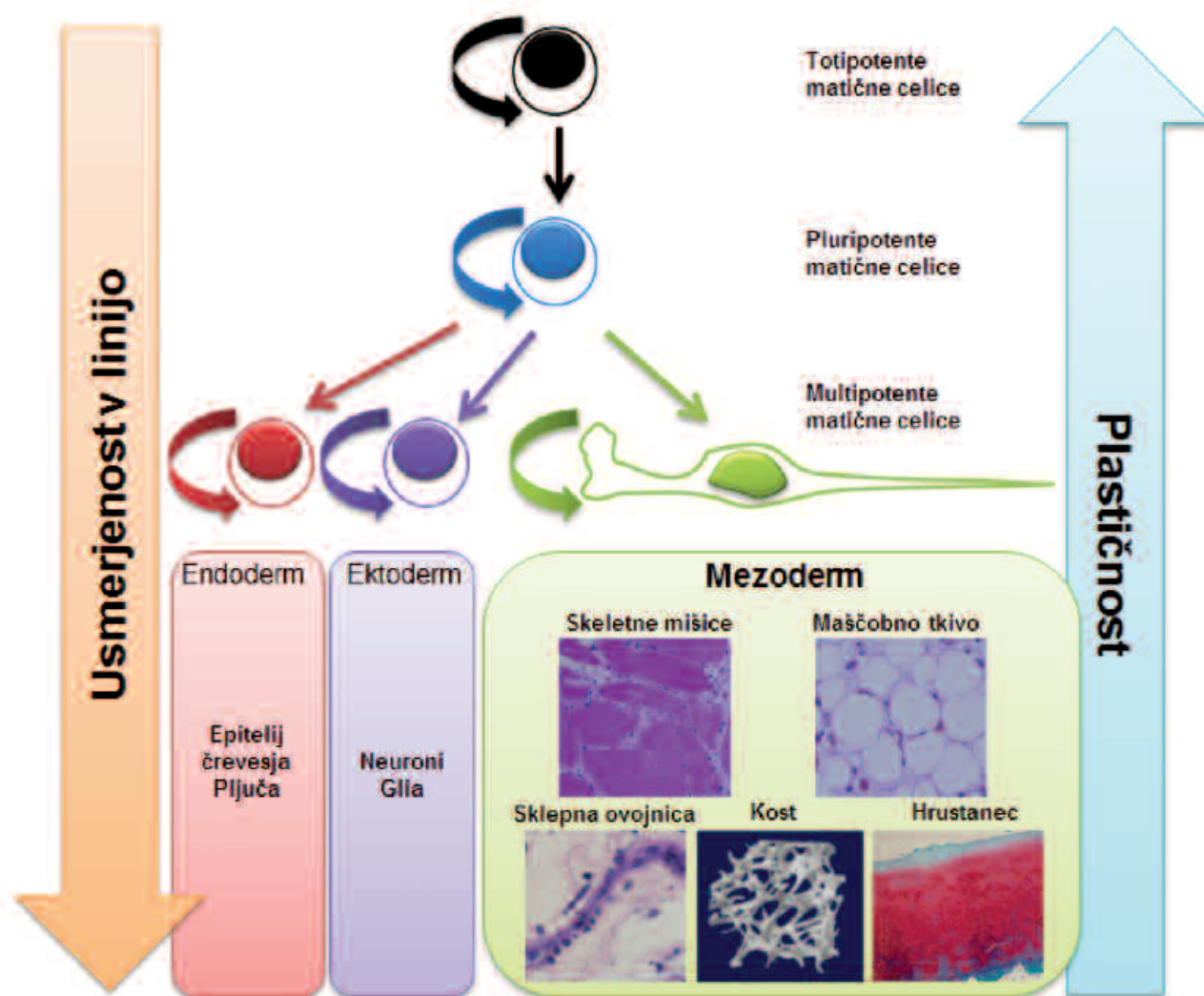
sten in jih zato lahko najdemo v skoraj vseh ožiljenih tkivih (2). Prisotnost matičnih celic v kosteh in skeletnih mišicah je tudi razlog, da imajo ta tkiva neverjetno sposobnost regeneracije. Ob ustreznih stimulatornih signalih, bodisi iz fiziološkega (fizična aktivnost) ali patološkega mikrookolja (zlomi, poškodbe mišic), se namreč aktivirajo, pomnožijo in usmerijo v določeno celično linijo, npr. v kostne (osteoblaste) ali mišične celice (miocite) ter migrirajo na mesto poškodovanega tkiva in ga regenerirajo. V skeletnih mišicah so najpomembnejše satelitske celice, ki so ključne v procesu mišične regeneracije. Hrustanec je slab vir matičnih celic, zato ima tudi veliko slabšo regeneracijsko sposobnost. Kadar lezije hrustanca ne dosežajo pod njim ležeče subhondralne kosti, je obnova tkiva omejena zgolj na povečano presnovno aktivnost zrelih hondrocitov v okolici poškodbe, zato je običajno nepopolna. Kadar pa poškodbe hrustanca segajo do kosti (osteohondralne lezije), se na mestu poškodbe razraste vezivno-hrustančno tkivo, za tvorbo katerega so odgovorne kostne MSC.

Čeprav so MSC odkrili že v drugi polovici prejšnjega stoletja kot celice, ki so sposobne samoobnove in obnove nekaterih drugih vrst celic (3, 4), pa je njihova definicija še vedno precej ohlapna, saj še vedno iščemo njihove specifične molekulske označevalce. Odkrili so številne označevalce zrelih celic, žal pa ne poznamo označevalca, s katerim bi nedvoumno identificirali neusmerjene multipotentne celice, med katere sodijo MSC (5). To je do določene mere razumljivo, saj se MSC zaradi svoje multipotentnosti lahko usmerjajo v različne celične linije. Leta 2006 je Mednarodna zveza za celično terapijo (*International Society for Cellular Therapy*) sprejela minimalne kriterije za definicijo MSC (preglednica 1). Razvoj modernih tehnologij (Cre/loxP, sekvenciranje naslednje generacije, CRISPR-Cas itd.) pa nam omogoča nadaljnje raziskave za njihovo boljše prepoznavanje, s tem pa tudi za njihovo uporabo v regenerativni medicini in celo v diagnostiki bolezni različnih organskih sistemov.

1.1 PREPOZNAVANJE MSC IN NJIHOVIH REGENERACIJSKIH SPOSOBNOSTI *IN VITRO*

MSC lahko izoliramo iz praktično katerega koli organa odraslega človeka. Pri tem pa moramo biti pozorni in pri vsaki izolaciji dokazati, da gre dejansko za MSC, kajti podobne lastnosti imajo tudi nekatere končne celične linije in predvsem fibroblasti, ki sestavljajo vezivno tkivo številnih organov. Izvirne lastnosti MSC, kot so sposobnost pritrditve na plastično površino gojilnih posod, pretvorbe v celice kosti (osteoblaste), hrustanca (hondrocite) in maščobnega tkiva (adipocite) ter





Slika 1: Hierarhija med matičnimi celicami in njihova vloga v procesu razvoja organov (ontogeneze).
Figure 1: Hierarchy between different stem cell types and their role in organ formation (ontogeny).

sposobnost tvorbe kolonij (CFU-F, colony forming unit fibroblast), so še vedno poglavitna merila, s katerimi jih preverjamo in dokazujemo *in vitro*. Po izolaciji iz tkiva se MSC med gojenjem *in vitro* v nekaj dneh pritrldijo na plastično površino (slika 2), zato je njihova izolacija dokaj enostavna. Zavedati pa se moramo, da pri izolaciji primarnih MSC skoraj vedno dobimo heterogeno kulturo, sestavljeno iz celic različnih razvojnih stopenj MSC in njihovih zrelih oblik, ki se vse nahajajo v izvornem tkivu. V primeru njihove izolacije iz kostnega tkiva so poleg MSC prisotni še osteoblasti, adipociti in njihove različne razvojne stopnje ter hematopoetske matične celice. Iz skeletne mišice pa lahko poleg tkivno specifičnih satelitskih celic sočasno izoliramo tudi druge vrste mišičnih matičnih

celic ter seveda same mišične celice (miocite) na različnih razvojnih stopnjah. Zrele, diferencirane celice se težko delijo in zato med gojenjem hitro odmrejo. Lahko pa se zgodi, da se v teh razmerah tudi zrele celice pretvorijo nazaj v bolj plastične predhodnike. Velik vpliv na to, katere vrste celic bomo izolirali in nato gojili *in vitro*, ima celični gojitveni medij. Uporaba medijev z dodatkom določenih rastnih dejavnikov prispeva k selektivni rasti in preživetju MSC in jih ohranja v multipotentnem stanju. Sortiranje izoliranih celic na osnovi pozitivnih ali negativnih označevalcev MSC pa nam omogoča delo z bolj homogeno in definirano populacijo. Pogosto na ta način izberemo mezenhimsko linijo, ki je negativna za CD45, CD31, CD34 in CD235a in omogoča gojenje homogenih celic brez

Preglednica 1: Celični označevalci in posebne lastnosti na osnovi katerih prepoznavamo MSC *in vitro* (6, 7).

Table 1: Cell markers and special features of MSCs as a basis for their *in vitro* identification (6, 7).

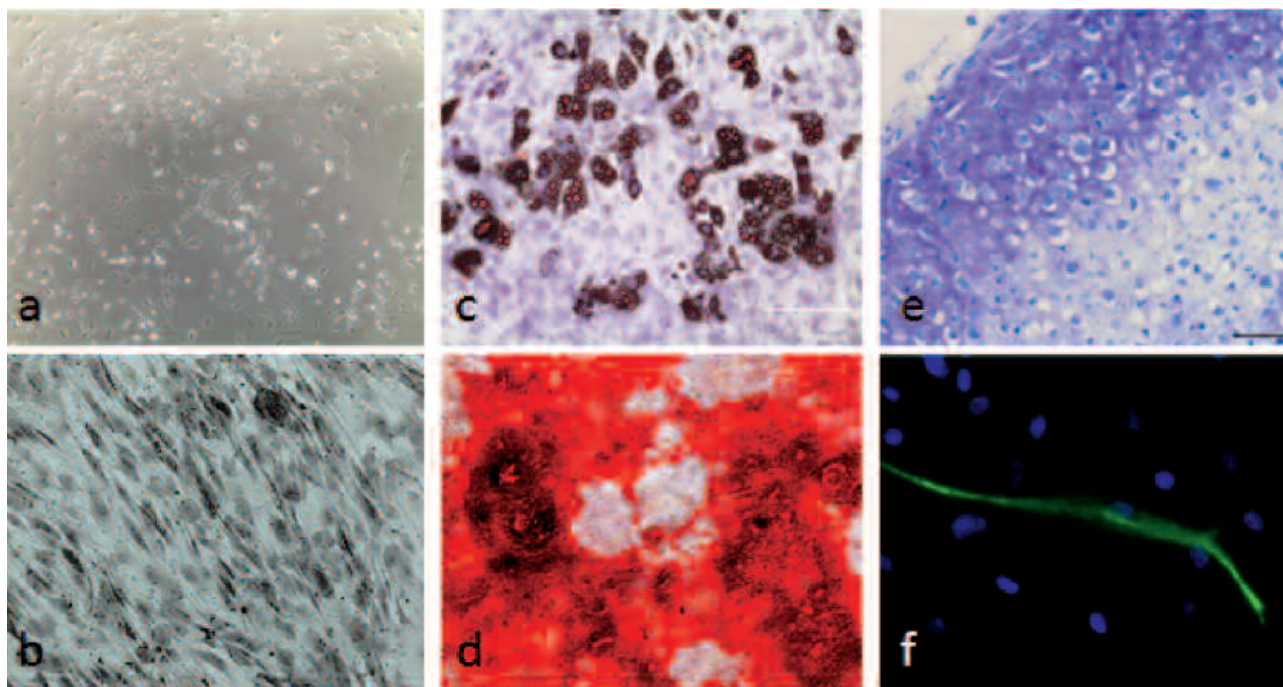
1. Sposobnost pritrditve na plastiko <i>in vitro</i>			
2. Celični označevalci	Negativni označevalci MSC	Pozitivni označevalci MSC	Pozitivni označevalci (samo za MSC iz mišic)
	CD45 (pan levkocitna linija)	CD73 (5' ektonukleotidaza)	Pax („paired box“ protein) 7, 3
	CD34 (zgodnji hematopoetski predhodniki)	CD90 (timusni celični antigen 1, Thy-1)	Myf5, MyoD
	CD14 ali CD11b (monociti/makrofagi)	CD105 (endoglin)	CD56 (neuralna celična adhezijska molekula)
	CD79α ali CD19 (B celična linija)		desmin
	HLA-DR (z interferonom γ stimulirane celice)		sindekan-3,-4
3. Sposobnost pretvorbe v osteoblaste, hondrocite in adipocite, za mišične MSC pa v miocite (dokazano s histološkim barvanjem) <i>in vitro</i>			

prisotnosti levkocitov, eritrocitov in endotelijskih celic. Ker MSC, gojene *in vitro*, izkazujejo fibroblastom podobno morfolgijo (sliki 2a in b), jih je težko prepoznati samo po videzu, zato moramo njihovo istovetnost potrditi z imunofenotipizacijo, torej z analizo že prej omenjenih označevalcev CD (cluster of differentiation) s pretočno citometrijo. Kot smo omenili, žal ni specifičnega označevalca MSC, zato moramo za njihovo prepoznavanje uporabljati kombinacijo dveh ali več različnih pozitivnih in negativnih označevalcev (preglednica 1). Za glavnega označevalca satelitnih celic iz mišic velja transkripcijski dejavnik Pax7, dokazali pa so še številne druge označevalce teh celic, odvisno od tega, ali se celice nahajajo v aktivnem ali mirujočem stanju. Poleg satelitnih celic so v skeletnih mišicah prisotne tudi druge matične celice, ki izražajo podobne označevalce kot MSC iz kostnega tkiva. Multipotentnost MSC oz. sposobnost njihove pretvorbe v osteoblaste, adipocite in hondrocite *in vitro* preverjamo bodisi z merjenjem izražanja specifičnih genov ali z uporabo specifičnih barvanj značilnih sestavin zunajceličnega matriksa (slike 2c-f). Po uspešni adipogenezi iz MSC nastale adipocite dokažemo s pomočjo barvila *Oil red O*, ki se veže na lipidne kapljice, vidne tudi pod mikroskopom (slika 2c). Po uspešni osteogenezi se iz MSC razvijejo osteoblasti, ki začnejo izločati kalcijev fosfat, na katerega se veže barvilo *Alizarin red S* (slika 2d). Med hondrogenezo nastali hondrociti, ki se nahajajo znotraj

hondrogene pelete, tvorijo glikozaminoglikane, na katere se veže barvilo toluidin modro (slika 2e). Najpomembnejša lastnost mišičnih MSC je sposobnost tvorbe mišičnih vlaken oz. miogeneza. Nastanek mišičnih vlaken dokažemo z uporabo indirektno imunofluorescence za različne označevalce, npr. desmin (slika 2f). Sposobnost tvorbe kolonij v celični kulturi *in vitro* odraža proliferacijsko sposobnost MSC in jo prav tako določamo. Sveže izolirane celice naselimo v gojilne posode v zelo majhni gostoti in po določenem času preštujemo nastale kolonije. MSC imajo izjemno sposobnost podvajanja, saj posamezna MSC, ki preide pet ciklov celične delitve tvori kolonije iz 32 (2⁵) celic. Ker za vse opisane teste multipotentnosti MSC *in vitro* potrebujemo določeno število celic, je njihova velika sposobnost pomnoževanja nedvomno prednost za delo z njimi, obenem pa omogoča tudi možnost avtologne (lastne) in alogenske (sorodnega ali nesorodnega darovalca) presaditve MSC za vrednotenje njihovih učinkov *in vivo*.

1.2 PREPOZNAVANJE MSC IN NJIHOVIH REGENERACIJSKIH SPOSOBNOSTI *IN VIVO*

Živalski modeli predstavljajo nepogrešljiv pristop ne le pri odkrivanju in vrednotenju tkivnih regeneracijskih sposob-



Slika 2: MSC, izolirane iz kosti (a) in skeletne mišice (b), po pritrditvi na plastiko in vitro. Adipogena (c), osteogena (d), hondrogena (e) in miogena (f) pretvorba MSC kot dokaz njihove multipotentnosti in vitro.

Figure 2: MSCs isolated from bone (a) and skeletal muscle (b) following their in vitro adherence to plastic surface. In vitro adipogenic (c), osteogenic (d), hondrogenic (e) and miogenic (f) differentiation of MSCs as a proof of their multipotency.

nosti MSC, ampak tudi za odkrivanje vzrokov mišično-skeletnih bolezni. Čeprav je v preteklem desetletju postalo jasno, da je regeneracijska sposobnost tkiv v odraslih organizmih posledica prisotnosti MSC v njih, pa predstavlja največjo težavo mobilizacija teh celic iz niš, v katerih se nahajajo. V tem poglavju predstavljamo najnovejše znanstvene pristope za odkrivanje in ocenjevanje regeneracijskega potenciala MSC z uporabo živalskih modelov.

1.2.1 Dvojno nukleozidno označevanje MSC v živalskih modelih

V tem primeru izkoriščamo lastnosti MSC, da se v tkivih nahajajo v mirujočem stanju z določeno, počasno frekvenco samoobnavljanja, kar pomeni, da so podvržene manjšemu številu celičnih ciklov. *In vivo* jih detektiramo tako, da poizkusni živali za določeno časovno obdobje apliciramo različne nukleozidne analoge, npr. kloro- ali jododeoksiuridin (CldU, IdU itd.), največkrat kar v pitni vodi (8). Po zaužitju jih vse telesne celice vgradijo v lastno DNA, nato pa jih izgubljajo tekom celičnih delitev. Nasprotno pa jih MSC zaradi redkejših delitev ohranijo v svojem genomu. Na poizkusni živali nato izvedemo določen stimulus za aktivacijo MSC, npr. povzročimo poškodbo hrustanca,

kosti ali mišice, in jim začnemo aplicirati še drug nukleozidni analog, npr. IdU, če je bil prvi CldU. MSC bodo IdU zaradi prehoda v intenziven proces aktivacije in pomnoževanja vgradile v svojo DNA, po končanem poizkusu, ko evtanaziramo žival, pa jih bomo opazili kot dvojno pozitivne celice (slika 3a). Ker pa se nukleozidni analogi zadržijo v celici le omejen čas (tekem 5 do 7 ciklov celične delitve), niso primerni za opazovanje in sledenje tistih populacij MSC, ki se delijo hitreje.

1.2.2 Transgeni živalski modeli za identifikacijo MSC *in situ*

Izjemen napredek pri odkrivanju in prepoznavanju MSC je omogočil razvoj transgenih živalskih modelov. Z njihovo uporabo lahko elegantno prostorsko, časovno in kinetično analiziramo MSC, pri čemer spremljamo, kje se te celice nahajajo, kdaj se pomaknejo iz niš in kam migrirajo (9). Pri transgenih živalskih modelih ustvarjamo trajne genetske spremembe v MSC *in situ*. Najbolj poznan način vzpostavitve transgenih živalskih modelov temelji na tehnologiji Cre/loxP, kjer zeleno genetsko spremembo ustvarimo s pomočjo encima Cre- rekombinaze. To ima za posledico izražanje reporterskega barvila, najpogosteje fluorescent-

nega, npr. zeleni fluorescenčni protein (GFP), Tomato itd., znotraj specifične celične populacije (slika 3b). Mišje modele Cre/loxP ustvarimo s križanjem dveh mišk, pri čemer genetsko ozadje prve živali spremenimo tako, da preko aktivacije specifičnega promotorja povzroči izražanje gena za Cre-rekombinazo samo v določeni subpopulaciji MSC. Druga žival vsebuje transgen, ki je pod nadzorom v vsaki celici prisotnega promotorja Rosa26. V transgenu je tudi reporterski gen (v nadaljevanju reporter), pred katerim je stop kodon, obdan z mesti loxP, ki jih cepi Cre-rekombinaza. Rezultat križanja teh dveh vrst mišk je torej transgeni model, ki vsebuje oba genetska elementa. To pomeni, da Cre-rekombinaza izreže stop kodon, zato se reporter izrazi samo v specifični podvrsti MSC, ki jo na ta način zaznamo. Ko se v določeni celici aktivira reporter, ga bodo vsebovale tudi vse njene potomke, zato jim bomo lahko sledili tako časovno kot tudi prostorsko (slika 3c).

1.2.3 Živalski modeli za oceno regeneracijskih sposobnosti MSC

Regeneracijske sposobnosti MSC lahko proučujemo na različnih živalskih modelih bolezni in poškodb mišično-skeletnega sistema *in vivo*, ki bolj ali manj uspešno posnemajo stanje pri človeku. Največ pozornosti namenjamo boleznim in poškodbam sklepnega hrustanca zaradi njegove nezadostne intrinzične regeneracijske sposobnosti. Osteoartritoza (OA), ki predstavlja zadnji stadij okvare sklepa, je namreč ogrožen terapevtski in tudi družbeni izziv. Zdravil z vplivom na strukturo hrustanca ne poznamo, trenutno zdravljenje temelji na simptomatskih (ne)medikamentoznih ukrepih, nadaljevalno pa na operativni artroplastiki celotnega sklepa. Na razpolago imamo živalske modele tako za primarne kot tudi za sekundarne oblike OA. Tako kot pri ljudeh je tudi pri živalih primarna OA posledica degenerativnih sprememb v sklepu, ki nastanejo spontano, najpogosteje s starostjo, ali z genetsko modifikacijo. Sekundarna OA pa je povezana z določenim vzrokom ali dejavnikom tveganja, pri čemer je najpogostejša posttravmatska OA. Živalske modele za slednjo najpogosteje ustvarimo z invazivnimi posegi, kjer poškodbo sklepa povzročimo kemijsko (intraartikularne injekcije steroidov, kolagenaze itd.) ali fizikalno (kirurška poškodba hrustanca, disekcija ligamentov, meniskusa itd.). Za proučevanje regeneracijske sposobnosti mišic in učinkovitosti regenerativnih terapij pa mišico najpogosteje poškodujemo z uporabo miotoksinov (kardiotoksin, noteksin), kemijsko z aplikacijo barijevega klorida ali pa z zaporednim zamrzovanjem in odmrzovanjem mišičnega tkiva s tekočim dušikom (10). V ta namen uporabljamo tako male (miši, podgane, zajci, morski prašički)

kot tudi večje (ovce, koze, psi, konji) živali. Miši najpogosteje uporabljamo zaradi možnosti spreminjanja njihovega genetskega materiala, hrustanec konja pa je najbolj podoben človeškemu (11). Najpogosteje proučujemo kolenske sklepe. Regeneracijske sposobnosti MSC lahko proučujemo bodisi s sledenjem endogeni populaciji MSC (transgeni živalski modeli ali dvojno nukleozidno označevanje) ali s transplantacijo sveže izoliranih ali predhodno ustrezno *in vitro* manipuliranih, avtolognih ali alogenskih MSC. Čeprav lahko z živalskimi modeli le do določene mere posnemamo dogajanja pri ljudeh, pa imajo veliko prednost v primerjavi s kliničnimi raziskavami dokazovanja učinkovitosti MSC pri regeneraciji tkiv zaradi možnosti izvedbe randomiziranih poizkusov. Kontrolna skupina živali namreč lahko predstavlja placebo kirurški poseg (*sham surgery*), velikokrat pa za kontrolo uporabimo kar nasprotni, netretirani sklep oz. mišico.

1.3 SUBPOPULACIJE MSC V MIŠIČNO-SKELETNEM SISTEMU

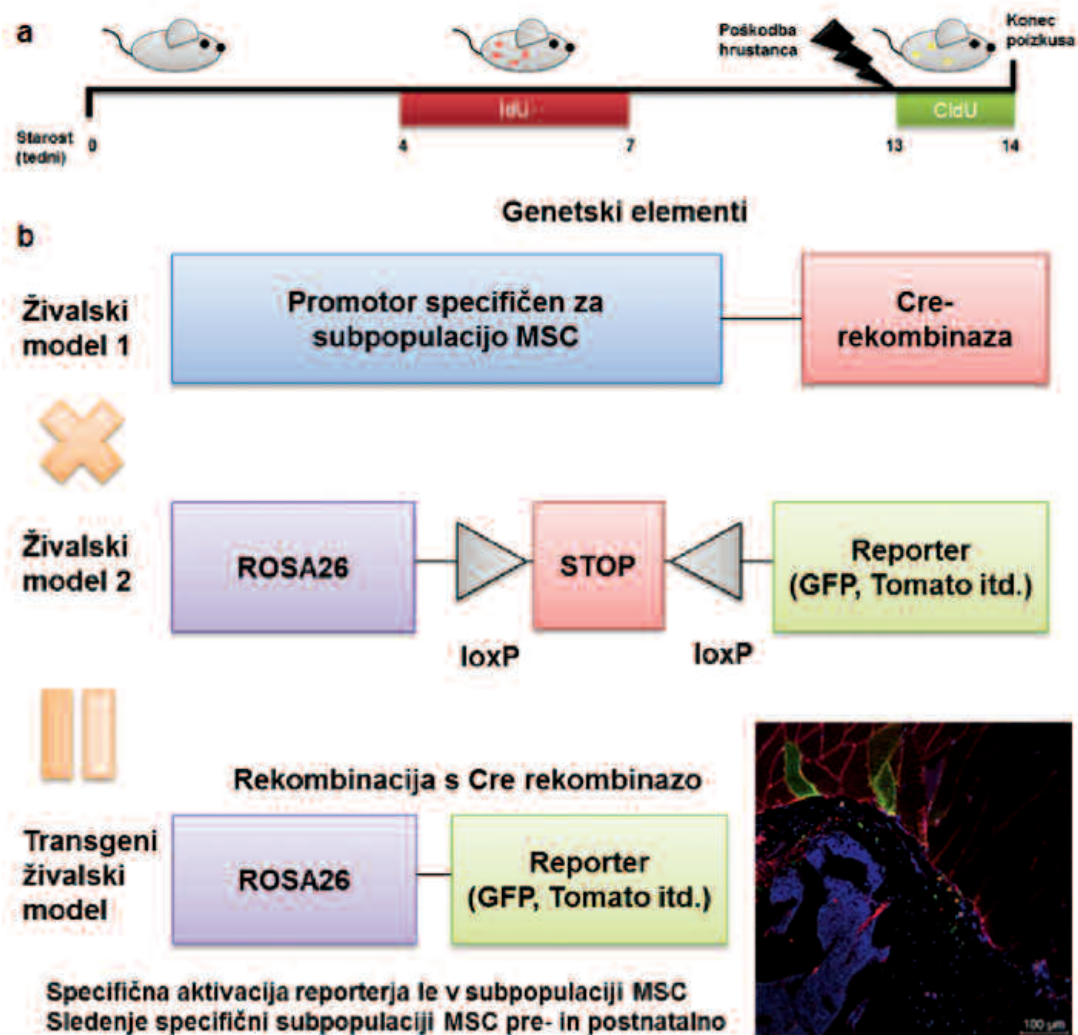
Z uporabo transgenih živalskih modelov so odkrili različne subpopulacije MSC v različnih tkivih mišično-skeletnega sistema, največ v kostnem mozgu, sinovijski ovojnici in skeletnih mišicah, dokazali pa so tudi njihovo vlogo pri regeneraciji različnih sklepnih in mišičnih struktur. V preglednici 2 so zbrane subpopulacije matičnih celic v kostnem tkivu in skeletnih mišicah, ki imajo dokazano pomembne vloge v mišično-skeletnem sistemu. Med seboj se razlikujejo v izražanju nabora molekularnih označevalcev in sposobnosti pretvorbe v različne končno diferencirane celice *in vitro* ali *in vivo*. Translacija teh rezultatov v klinično prakso pa je zaradi pomanjkanja specifičnih označevalcev za te subpopulacije pri človeku velikokrat otežena (12). Pri delu s človeškimi MSC največkrat uporabljamo naslednje molekulske označevalce: CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54 in CD166.

2 MSC PRI ZDRAVLJENJU MIŠIČNO-SKELETNIH BOLEZNI

2.1 PROTIVNETNO/IMUNOSUPRESIVNO DELOVANJE MSC

Eden od osnovnih pogojev za uspešno in kakovostno regeneracijo tkivnih poškodb je odsotnost vnetja. Zato je sposobnost MSC, da delujejo izrazito protivnetno z zavi-





Slika 3: Različni modeli za prepoznavanje MSC ter oceno njihovih regeneracijskih sposobnosti in vivo. Shematski prikaz dvojnega nukleozidnega označevanja MSC pri poskusni živali (a). Prikaz uporabe genetskih strategij za sledenje MSC v transgenih živalskih modelih, ki jih dobimo s križanjem dveh, genetsko različnih vrst živali (b). Histologija kolenskega sklepa v mišjem transgenem živalskem modelu (c), kjer so s fluorescentnim proteinom GFP (zeleno) označene celice, ki izražajo specifični označevalec MSC, s fluorescentnim označevalcem Tomato (rdeče) pa vse ostale celice, celična jedra so obarvana z barvilom DAPI (modro).

Figure 3: In vivo models of MSCs identification and assessment of their regenerative potential. Schematic representation of double nucleoside labelling in an experimental animal (a). Genetic strategies used for lineage tracing of MSCs in a transgenic animal model, created by cross-breeding of two genetically different strains (b). Histology of transgenic mouse model knee joint (c), showing GFP-labelled cells expressing a specific MSCs marker (green), with the rest of the cells being labelled with Tomato (red), and nuclei with DAPI (blue).

ranjem imunskih odzivov prirojene in pridobljene imunosti, enako pomembna kot njihove regeneracijske sposobnosti. Protivnetno imunomodulatorno delovanje MSC je predmet intenzivnih raziskav ter številnih kliničnih študij, predvsem eksperimentalno zdravljenje akutne bolezni presadka zoper gostitelja po alogenski presaditvi krvotvornih matičnih celic ter Chronove in drugih kroničnih vnetnih bolezni. Čeprav

še ne poznamo vseh mehanizmov njihovega zaviralnega delovanja na provnetne efektorske celice imunskega sistema, pa se je v zadnjih letih na tem področju nabralo kar precej z znanstvenimi dokazi podprtih spoznanj. Danes vemo, da lahko MSC delujejo imunomodulatorno bodisi preko neposrednih medceličnih interakcij ali pa posredno parakrino, z izločanjem različnih topnih imunosupresivnih

Preglednica 2: Subpopulacije MSC z dokazano vlogo v mišično-skeletnem sistemu.

Table 2: Subpopulations of MSCs with proven role in musculoskeletal system.

Subpopulacija	Anatomska lokacija in delež v MSK sistemu	Fenotip	Vloga v MSK sistemu	Objavljeno v
Leptinski receptor	0.3% celic v KM	CD51/PDGFR β /PDGFR α /CD105/Prx-1/Cxcl12+Sca-1 +/-	glavni vir osteoblastov in adipocitov v KM odraslega organizma	Zhou Cell Stem Cell 2014 (13)
Nestin	4% CD45- celic v KM	CD45/CD31-	v kostni remodelaciji, pretvorba v osteoblaste in hondrocite	Mendez-Ferrer Nature 2010 (14)
	0.2% CD45/CD235a/CD31-celic v KM odraslega organizma	PDGFR α /CD51/CD105+		Pinho JEM 2013 (15)
mSSC	0.5% v epifiznih ploščah	CD51/CD200+ CD105-	tvorba kosti, hrustanca in veziva tudi izven skeletnega sistema	Chan/Seo/Chen/Lo Cell 2015 (16)
Gremlin1 (antagonist BMP)	0.0025% celic v epifiznih ploščah	CD105+, Sca-1/PDGFR α -	rast kosti, kostna remodelacija in celjenje zlomov (tvorba osteoblastov, hondrocitov in retikularnih celic KM, ne pa tudi adipocitov)	Worthley Cell 2015 (17)
Linija Gdf5	sinovijska ovojnica	CD45/CD31/CD16/CD11b-PDGFR α /Sca1/gp38/CD200/CD73/CD90+	regeneracija hrustanca po poškodbi, sposobnost morfogeneze vseh elementov sklepa	Roelofs/Zupan Nature Comm 2017 (18)
Satelitne celice	med bazalno membrano in sarkolemo v skeletnih mišicah	Pax7+/CD56+/Myf5+	glavni vir celic za regeneracijo skeletnih mišic	Yin Physiol Rev 2013 (19)
PDGFRα+ mišične matične celice	intersticij skeletnih mišic	CD45/CD31-/SM/C-2.6/NG2-PDGFR α +PDGFR β +	akumulacija maščobe v mišicah (sposobnost adipogeneze, ne pa tudi miogeneze)	Uezumi Nature Cell Biol 2010 (20)
NG2	skeletne mišice	NG2/Nestin/PDGFR β /CD146+PDGFR α -	regeneracija mišic v fizioloških in patoloških pogojih	Birbrair Stem Cells Dev 2013 (21)
Periciti NG2/ALP+	na steni mikrovaskulature skeletne mišice	CD45/CD133/CD31/CD34-CD44/CD146/CD13/CD49b/PDGFR β +	regeneracija mišičnih vlaken pri mišični distrofiji	Dellavalle Nature Cell Biol 2007 (22)

Legenda: MSK: mišično-skeletni; KM: kostni mozeg; mSSC: mišje skeletne matične celice; BMP: kostni morfogenezni protein; Gdf5: rastni in diferenciacijski dejavnik 5; Pax7 ali »paired box« protein 7; Myf5: miogeni dejavnik 5; NG2: nevralni/glijalni antigen 2; ALP: alkalna fosfataza; PDGFR α / β : receptor za trombocitni rastni dejavnik α / β .



dejavnikov (23, 24). Njihovo zaviralno delovanje na celice prirojene imunosti, makrofage, dendritične celice (DC), naravne celice ubijalke (NK), naravne T-celice ubijalke (NKT) in mastocite, poteka preko različnih molekulskih mehanizmov. Tako MSC zavirajo polarizacijo makrofagov v njihov vnetni podtip M1, in sicer z izločanjem interleukina 6 (IL-6), granulocitne in makrofagne kolonije vzpodbujajočega dejavnika (GM-CSF) ter prostaglandina E2 (PGE2), pri čemer posledično prevlada protivnetni podtip M2 (proizvodnja in izločanje IL-10) (25). PGE2, ki ga izločajo MSC, prispeva tudi k inhibiciji degranulacije makrofagov in s tem k preprečevanju sproščanja histamina, prav tako pa zavira tudi aktivacijo, diferenciacijo in efektorske funkcije DC (v kombinaciji z IL-6 favorizira nastanek regulatornih/tolerogenih DC, ki izločajo izrazito protivnetni transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β) in celic NK (25). Med topnimi imunosupresivnimi dejavniki, ki jih proizvajajo in izločajo MSC, sta tudi TGF- β in encim indolaminska-2,3-dioksigenaza (IDO), ki pretvarja triptofan, eno od ključnih aminokislin za ustrezno delovanje celic T, v kinurenin. Tako TGF- β kot tudi IDO močno zavirata efektorske funkcije celic NK (25). Celice NKT, tako kot DC, povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost. Pomembne so pri odstranjevanju z virusi okuženih in tumorskih celic. MSC spremenijo njihove fenotipske značilnosti in zavirajo njihovo proliferacijo, proizvodnjo vnetnih citokinov in citotoksično delovanje. To dosežejo bodisi z neposrednimi medceličnimi interakcijami ali pa preko izločanja TGF- β in PGE2 (24). Tarče imunosupresivnih učinkov MSC so tudi efektorske celice pridobljene imunosti, limfociti B in T. Tako MSC zavirajo aktivacijo, proliferacijo in izražanje kemokinskih receptorjev limfocitov B ter preprečujejo njihovo pretvorbo v plazmatke, ki proizvajajo protitelesa. To dosežejo tako z neposrednimi medceličnimi interakcijami (vezava inhibitornih receptorjev PD-1 na limfocitih B z njihovimi ligandi PDL-1 na MSC) kot z izločanjem topnih dejavnikov (galektin-9) (24, 25). Limfocite T delimo na celice CD4+ in CD8+ glede na molekulske označevalce, ki jih izražajo na svojih površinah. Med limfociti T CD4+ obstajajo različni podtipi (Th1, Th2, Th17, Treg itd.), ki se med seboj razlikujejo glede na vrste citokinov, ki jih proizvajajo, in seveda glede na efektorske funkcije, ki jih opravljajo, medtem ko večino celic CD8+ predstavljajo citotoksični limfociti T. Celice T pomagalk tipa 1 (Th1) proizvajajo vnetne citokine (IL-2, IFN- γ), celice T pomagalk tipa 2 (Th2) protivnetne (IL-4, IL-13), celice T pomagalk tipa 17 (Th17) vnetni IL-17, naravni regulatorni limfociti Treg pa protivnetni IL-10 (25). Vsi limfociti T s svojimi klonsko porazdeljenimi T-celičnimi receptorji (TCR) specifično prepoznajajo antigene v obliki peptidov, vezanih na molekule pglavitnega kom-

pleksa tkivne skladnosti razredov I (limfociti T CD8+) in II (limfociti T CD4+), ki jih pri ljudeh označujemo s kratico HLA (*human leukocyte antigens*). MSC preprečujejo proliferacijo limfocitov T neodvisno od omejitev na nivoju molekul HLA, in sicer s proizvodnjo in izločanjem PGE2, IDO, hepatocitnega ravnega dejavnika (HGF), TGF- β , dušikovega oksida (NO), galektina 1 ter z neposrednimi medceličnimi interakcijami preko vezave PD-1 na PD1-L (24, 25). Poleg tega MSC spodbujajo tudi nastajanje induciranih regulatornih limfocitov T (npr. Tr1), ki z izločanjem IL-10 in TGF- β zavirajo aktivacijo celic T. Ko so proučevali vplive MSC na celjenje kožnih ran so dokazali, da le-te s svojim parakrinim delovanjem pospešujejo celjenje, angiogenezo in remodeliranje zunajceličnega matriksa ter tako omogočajo popolno regeneracijo funkcionalnega tkiva brez nastanka brazgotin (26, 27).

2.2 MSC V REGENERATIVNI MEDICINI

Regenerativna medicina omogoča obnovo strukture in funkcije poškodovanih tkiv in organov. Gre za razmeroma nove načine zdravljenja z uporabo zunanjih celičnih virov, ki so običajno matične ali druge progenitorske celice (28). Za zdravljenje mišično-skeletnih bolezni večinoma uporabljamo avtologne (bolniku lastne) celice, nekaj novejših raziskav pa že proučuje tudi možnost uporabe alogenskih (darovanih) celic (29, 30). Mehanizem delovanja MSC pri regeneraciji tkiv je povezan z izražanjem številnih citokinov, kemokinov in ravnih dejavnikov, ki izboljšujejo angiogenezo, zavirajo vnetje in inhibirajo apoptozo ter spodbudijo endogene popravljalne mehanizme. Samo usmerjeno diferenciacijo MSC pa lahko dosežemo z ustrezno mikrookoljsko, mehansko in biološko stimulacijo celic. Vse naštetje lastnosti MSC močno podpirajo njihovo uporabo pri številnih patoloških stanjih, za katere sta značilna vnetje in degeneracija tkiva. Klinična uporaba MSC v mišično-skeletnem sistemu se vsako leto povečuje. Podatke o aktualnih kliničnih raziskavah na tem področju smo zbrali v preglednici 3.

Po neobjavljenih podatkih je število bolnikov z boleznimi mišično-skeletnega sistema, zdravljenih z MSC, še mnogo večje. Klinično MSC uporabljamo predvsem za zdravljenje tkiv, ki se sama po sebi slabo obnavljajo (sklepni hrustanec), in tistih, ki imajo zaradi določenega kroničnega stanja prizadeto sposobnost celjenja (npr. kronične rupture tetiv in mišic, psevdootroze kosti). V klinični praksi MSC apliciramo bodisi z neposrednim injiciranjem njihove suspenzije v sklep ali tetivo ali pa kirurško, kjer jih dodamo neposredno na mesto okvare, običajno na biokompatibilnem celičnem nosilcu (54). Glavnina kliničnih raziskav zaenkrat poteka samo v obliki predstavitev zdravljenih serij bolnikov, brez kontrolnih

Preglednica 3: Klinična uporaba MSC za regeneracijo mišično-skeletnega (MSK) sistema.

Table 3: Clinical application of MSCs for musculoskeletal (MSK) system regeneration.

Patologija v MSK sistemu	Objavljene raziskave
Osteoartroza in hondralne lezije velikih sklepov	Sánchez M BioMed Res Int 2016 (31) Pers YM Stem Cells Transl Med 2016 (33) Freitag J BMJ Open 2015 (35) Davatchi F Int J Rheum Dis 2015 (37) Vega A Transplantation 2015 (39) Vangsness CT J Bone Joint Surg 2015 (41) Akgun I Arch Ortop Trauma Surg 2015 (43) Wong K Arthroscopy 2013 (32) Orozco Transplantation J 2013 (34) Jo CH Stem cells 2014 (36) Davatchi F Int J Rheum Dis 2011 (38) Centeno CJ Pain Physician 2008 (40) Centeno CJ J Pain Res 2015 (42) Koh YG Arthroscopy 2016 (44)
Tendinopatije (Ahilova tetiva, lateralni epikondilitis, rotatorna manšeta)	Lee SY Stem cells 2015 (45) Centeno CJ J Pain Res 2015 (42)
Osteonekroza (okvara kosti zaradi motnje prekrvavitve po poškodbi, uživanju določenih zdravil ali zaradi spontanega nastanka) kolčne glavice in femoralnih kondilov kolen	Chen C Mol Med Rep 2016 (46) Daltro Cerqueira C Stem Cell Res Ther 2012 (47) Aoyama T Tissue Eng Part B Rev 2014 (48) Rastogi S Musculoskelet Surg 2013 (49) Zhao D Bone 2012 (50)
Celjenje psevdootroze kosti po zlomu	Weel H BMC Musculoskelet Disord 2015 (51) Kim SJ Cell Transplant 2017 (52)

skupin. Ne glede na to pa v enem od zadnjih preglednih prispevkov o vplivu MSC na regeneracijo hialinega hrustanca Reissis s sod. poročajo o njihovem predominantno pozitivnem delovanju z zelo malo neželenimi učinki (53). Poudarjajo tudi, da je klinično raziskovanje vplivov MSC na obnovo hrustanca še zelo v začetni fazi, zato ni jasno, kateri vir MSC, kolikšna koncentracija MSC, kateri način njihove vsaditve, morebitna uporaba nosilcev ali rastnih dejavnikov ter kakšen program rehabilitacije so najboljši oz. najučinkovitejši. Pri kirurškem zdravljenju simptomatskih, zamejenih hrustančnih lezij, ki se slabo celijo in lahko napredujejo v generalizirano OA, se pojavlja vprašanje, ali je dodaten vnos koncentriranih avtolognih MSC, izoliranih iz druge lokacije, sploh potreben oz. ali ni dovolj zgolj kombinacija biokompatibilnega nosilca in fizioloških koncentracij MSC iz lokalnega okolja lezije (največkrat iz subhondralne kosti). V nedavnih sistematskih preglednih prispevkih Kon in sod. ter Deng in sod. ugotavljajo veliko heterogenost uporabljenih celičnih pripravkov, biomaterialov in kliničnih protokolov (55, 56). Oboji so mnenja, da sta oba omenjena pristopa glede vira MSC varna in uspešna, pri čemer o terapevtskih prednostih enega oz. drugega zaradi omejenega

števila preliminarnih rezultatov še ne morejo govoriti. Opazili pa so, da se je v zadnjih letih povečal trend dostave predhodno *in vitro* namnoženih avtolognih MSC, pridobljenih iz druge lokacije, v hrustančne lezije. Najpogostejši vir MSC za obnovo skeletno-mišičnega sistema še vedno predstavlja kostni mozeg, čeprav se v zadnjem času pojavlja vedno več raziskav, v katerih uporabljajo tudi MSC, pridobljene iz maščobnega tkiva/lipoaspirata. MSC je namreč v kostnem mozgu zelo malo, le 0.01% do 0.001 % vseh enojedrnih celic. Za pridobivanje terapevtsko primerne števila celic moramo zato MSC več tednov namnoževati v laboratoriju, to pa je povezano z velikimi stroški in zakonskimi omejitvami. Da bi se temu postopku izognili, so razvili nove, t. i. enostopenjske postopke, ki jih izvedemo v sami operacijski dvorani v okviru operativnega posega. Na Ortopedski kliniki UKC Ljubljana v sodelovanju s podjetjem Educell že od leta 2014 uporabljamo filtrirane MSC iz kostnega mozga. Doslej smo na ta način zdravili 42 bolnikov z omejenimi hondralnimi ali osteohondralnimi lezijami (27 kolen, 13 gležnjeve in 2 kolka). MSC pridobimo s punkcijo medenične kosti, iz katere odzamemo 20 do 30 mL aspirata kostnega mozga z dodatkom antikoagulant. Aspirat nato znotraj



operacijske dvorane s pomočjo posebne celične kolone obdelamo tako, da odstranimo glavnino eritrocitov in zmanjšamo deleže drugih večjedrnih celic, ki niso pomembne za regeneracijo. Na koncu dobimo 3 do 5 mL celičnega pripravka, v katerem je koncentracija MSC 1.5-krat povečana, in ga na mesto lezije prenesemo skupaj z ustreznim celičnim nosilcem (kolagensko-hidroksiapatitna membrana, kolagenski gel, fibrinsko lepilo). Seriji na ta način zdravljenih bolnikov redno sledimo. Doslej je bilo zdravljenje praviloma uspešno. Zabeležili smo le štiri propade vsadka, ki pa jih nismo mogli povezati z uporabo MSC, temveč so bili posledica drugih vzrokov.

3 POTENCIAL MSC ZA DIAGNOSTIKO MIŠIČNO-SKELETNIH BOLEZNI

MSC so zaradi svojih regeneracijskih sposobnosti najpogostejša tarča raziskav na področju regenerativne medicine. S spoznavanjem njihovih lastnosti, ki so povezane tako s fiziološko vlogo (remodelacija kosti, mišična regeneracija itd.) kot tudi s patološkimi stanji (zlomi, degenerativne bolezni itd.) se nakazuje tudi njihova potencialna uporaba v diagnostiki mišično-skeletnih bolezni. Same MSC s patološko spremenjenimi lastnostmi oz. njihovi produkti, zlasti če bi jih lahko zaznali oz. določili v periferni krvi, predstavljajo potencialne diagnostične označevalce za zgodnje neinvazivno odkrivanje degenerativnih sprememb. Vse tri najpogostejše degenerativne bolezni mišično-skeletnega sistema, osteoporoza (OP), OA in sarkopenija, še vedno najpogosteje odkrivamo v poznih fazah, ko je možno le še njihovo simptomatsko zdravljenje. Vloga MSC v patogenezi teh bolezni je v glavnem še neznana, obstajajo pa dokazi, da se pri OP zmanjša število MSC in/ali njihova sposobnost osteogene pretvorbe. Zdi se, da postanejo MSC rezistentne na aktivacijske signale, ki nastanejo pri poškodbah tkiv ali pa da pride do sprememb v njihovem mikrokolju. Ker predstavljajo MSC redke celične populacije in ker zaradi svoje multipotentnosti izražajo številne gene ter molekulske označevalce, ki so prisotni tudi na drugih, zrelih oz. diferenciranih linijah (5), je pomanjkanje raziskav o njihovi diagnostični uporabnosti povezano predvsem s pomanjkanjem občutljivih metod za njihovo specifično detekcijo. Najnovejše tehnologije, kot je npr. sekvenciranje naslednje generacije (NGS, *next generation sequencing*), omogočajo določanje transkriptoma na nivoju posamezne celice in so že pomagale odkriti specifične subpopulacije matičnih celic

pri raku črevesja, ki napovedujejo relaps bolezni (58). Pri zgodnji diagnostiki bolezni mišično-skeletnega sistema stremimo k temu, da bi MSC pridobili neinvazivno, nato pa ugotovili, če je njihova sposobnost osteogene, hondrogene in miogene diferenciacije povezana s pojavom teh bolezni, ter poiskali načine, kako jih ponovno spodbuditi k regeneraciji tkiv (kosti, hrustanca in mišic). Dokazali so že, da imajo MSC, izolirane iz tkiv starejših bolnikov, zmanjšano sposobnost pomnoževanja in osteogene pretvorbe *in vitro* (59), poleg tega pa so pri manj gibljivi in slabotnejši starejši populaciji dokazali zmanjšanje števila cirkulirajočih osteogenih predhodnikov v krvi (60). V nadaljevanju bomo predstavili, kaj je že znanega o vlogi MSC pri patogenezi nekaterih mišično-skeletnih bolezni. Njihova uporaba pri diagnostiki teh bolezni in predvsem načini, kako spodbuditi endogene MSC za uspešno regeneracijo mišično-skeletnih tkiv, pa torej ostajajo velik zalogaj za nadaljnje raziskave.

3.1 OSTEOPOROZA

Primarna OP je progresivna sistemska mišično-skeletna bolezen, ki jo kljub napredku na področju njene diagnostike in zdravljenja še vedno največkrat odkrivamo šele ob prvem zlomu, ki pa je zaradi zapletov velikokrat usoden za posameznika. Osteoblasti, ki so odgovorni za izgradnjo kostnega tkiva, izvirajo iz MSC. Te celice so zato lahko tudi vzrok za zmanjšano nastajanje in/ali dozorevanje osteoblastov ter posledično zmanjšanje obsega izgradnje kostnega tkiva, pri čemer naj bi pomembno vlogo igralo spremenjeno mikrokolje v kostnem mozgu. Prisotnost različnih dejavnikov, predvsem vnetnih citokinov, adipokinov, signalnih molekul Wnt, TGF/BMP itd., naj bi ustvarila mikrokolje, ki je ugodnejše za usmerjanje MSC v proces adipogeneze kot osteogeneze, kar poznamo kot hipotezo o debelosti kosti pri OP (5, 61). Poleg sprememb v njihovem mikrokolju pa obstajajo dokazi, da pride do sprememb tudi znotraj samih MSC. Primerjava transkriptomov človeških MSC, izoliranih iz bolnikov z OP in kontrolne skupine brez OP, je pokazala, da pride pri OP do intrinzične okvare MSC, ki je povezana s slabšim samoobnavljanjem in osteogeno pretvorbo (62). Prav tako so pri bolnikih z OP po artroplastiki opazili bolj pogosto (tudi do 50 %) omajanje proteze, kar naj bi bila posledica zmanjšane osteoblastne usmeritve MSC ter s tem povezane nezmožnosti osteointegracije proteze (63). Vedno več je tudi rezultatov raziskav o serumskih mikroRNA (miRNA), značilnih za pomenopavne bolnice z OP (64). Nekatere med njimi dokazano vplivajo na delovanje MSC. Tako miR-382-3p stimulirajo osteogenezo, med tem ko jo miR-550a-5p inhibirajo, obe vrsti miRNA pa zmanjšata tudi adipogenezo (65).

3.2 SARKOPENIJA

Sarkopenija, ki predstavlja zmanjšanje mišične mase in funkcije, si z OP deli številne podobnosti, npr. demografsko sliko bolnikov, visoko prevalenco in velik socialno-ekonomski vpliv. Sarkopenični bolniki naj bi bili bolj nagnjeni k nastanku OP, velja pa tudi obratno (66). Za razliko od OP pa klinični kriteriji za diagnostiko sarkopenije niso jasno definirani, tako da stopnja prevalence variira med 10 % vseh posameznikov nad 65 let in 30 % pri moških, starih več kot 80 let. Sarkopenija je večfaktorski sindrom, ki je posledica hormonskih motenj, vnetja in zmanjšane regenerativne sposobnosti mišic zaradi okrnjene aktivacije satelitnih celic. Do izgube skeletne mišične mase in zmanjšane moči mišic pride zaradi atrofije mišičnih vlaken tipa 2, heterogene velikosti mišičnih vlaken, kopičenja intramuskularnega vezivnega tkiva in maščobe ter zmanjšane oksidativne kapacitete mišic. Dokazali so tudi številne, s starostjo povezane spremembe okolja v nišah satelitnih celic, npr. z IL-6 posredovano zvečano signaliziranje Jak/Stat, ki zmanjšajo njihovo regeneracijsko sposobnost (67). Raziskave na področju zdravljenja te bolezni so bile do sedaj, bolj kot na celično terapijo, usmerjene v promocijo hipertrofije mišičnih vlaken ter aktivacijo endogenih satelitnih celic s pomočjo farmakoloških (jak inhibitorji itd.) in nefarmakoloških ukrepov (68, 69).

3.3 MIŠIČNA DISTROFIJA

Duchennova mišična distrofija (DMD) je na kromosom X vezana progresivna in degenerativna bolezen mišic, ki je posledica spontane mutacije v genu za distrofin, njen rezultat pa je nefunkcionalni protein, ki veže citoskelet mišičnih vlaken z zunajceličnim matriksom. Ker je distrofična mišica konstantno poškodovana, je regenerativni proces ves čas aktiven, zato rekrutira satelitne celice v večjih količinah. Kljub temu je regeneracija distrofične mišice nepopolna, posledica pa je progresivna zamenjava mišičnega tkiva z maščobnim in fibroznim (70). Poleg tega, da je distrofin izražen v zrelih mišičnih vlaknih, je prisoten tudi v satelitnih celicah, kjer igra pglavitno vlogo v regulaciji njihove polarosti in asimetrične delitve. Pri asimetrični delitvi iz ene satelitne celice nastane ena progenitorna celica ter ena satelitna celica. V odsotnosti distrofina pride zato do zmanjšane števila asimetričnih in večjega števila abnormálnih delitev, kar vodi v zmanjšano količino miogenih predhodnikov (71, 72). Terapije, ki temeljijo na uporabi matičnih celic, veljajo za najbolj obetavne metode zdravljenja mišičnih distrofij. Pri tem lahko uporabimo dve strategiji. Prva je avtologna presaditev matičnih celic, kjer izoliramo celice bolnika z DMD, jih gensko spremenimo *in vitro* tako, da pono-

vno izražajo distrofin, ter jih nato vsadimo nazaj v bolnika. Druga pa je alogenska transplantacija matičnih celic posameznika s funkcionalnim genom za distrofin. Čeprav so rezultati zdravljenja DMD spodbudni, pa so te metode omejene, saj je potrebno veliko število injekcij, lahko se pojavi imunski odziv na injicirane satelitne celice ter smrt večine injiciranih celic v prvih 72 urah po aplikaciji. Vse več raziskav zato poteka na ostalih populacijah celic, ki imajo sposobnost tvoriti mišična vlakna, npr. pericitih, mesoangioblastih, celice PW1+ itd. Te celice so sicer številnejše in lažje dostopne, vendar pa imajo v primerjavi s satelitnimi omejeno sposobnost miogene diferenciacije (73).

4 SKLEP

Mezenhimske matične celice so redka in zaradi svoje heterogenosti še dokaj neraziskana celična populacija. Imajo izjemno sposobnost regeneracije in imunosupresije, najdemo pa jih v številnih tkivih odraslih ljudi. To pomeni, da ima vsak odrasel človek svoje endogeno »orodje« za obnovo tkiv, ki pa je še v veliki meri neizkoriščeno. Ravno zaradi omenjenih lastnosti imajo MSC velik potencial za zdravljenje degenerativnih bolezni in poškodb mišično-skeletnega sistema, kjer intraoperativno procesirane MSC iz kostnega mozga in maščobnega tkiva že kažejo prve pozitivne učinke pri zdravljenju osteo-hondralnih lezij in OA sklepov ter kroničnih tendinopatij. Nove tehnologije, ki bodo omogočale njihovo boljše identifikacijo, bodo odprle nove možnosti za njihovo uporabo v regenerativni medicini. Znanja o spremembah, ki so jim MSC podvržene pri določenih patoloških stanjih, pa bodo odprla možnosti za njihovo uporabo pri diagnostiki degenerativnih bolezni, kot sta OP in OA, predvsem v smislu njenega zgodnejšega odkrivanja in novih načinov zdravljenja teh bolezni.

5 LITERATURA

1. Sacchetti B, Funari A, Remoli C et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports* 2016; 6: 897-913.



2. Crisan M, Yap S, Casteilla L et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 301-313.
3. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif* 1970; 3: 393-403.
4. Pittenger M, Mackay A, Beck S et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
5. Pino AM, Rosen CJ, Rodríguez JP. In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res* 2012; 45: 279-287.
6. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
7. Jankowski R, Deasy B, Huard J. Muscle-derived stem cells, *Gene Ther* 2002; 9: 642-647.
8. Kurth TB, Dell'Accio F, Crouch V et al. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1289-1300.
9. Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 513-518.
10. Hardy D, Besnard A, Latil M et al. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0147198.
11. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* 2016; 11: 1-27.
12. Bianco P, Cao X, Frenette PS et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 2013; 19: 35-42.
13. Zhou BO, Yue R, Murphy MM et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 154-168.
14. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466: 829-834.
15. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M et al. PDGFR α and CD51 mark human Nestin + sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* 2013; 210: 1351-1367.
16. Chan CKF, Seo EY, Chen JY et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* 2015; 160: 285-298.
17. Worthley DL, Churchill M, Compton JT et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 2015; 160: 269-284.
18. Roelofs AJ, Zupan J, Riemen AHK et al. Joint morphogenetic cells in the adult synovium. *Nat Commun* 2017; 8: 15040.
19. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* 2013; 93: 23-67.
20. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 143-152.
21. A. Birbrair, Zhang T, Wang ZM et al. Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 2298-2314.
22. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 255-267.
23. Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J* 2014; 90: 643-647.
24. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother* 2016; 2: 3-20.
25. Glenn JD. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014; 6: 526-539.
26. Doi H, Kitajima Y, Luo L et al. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Sci Rep* 2016; 6: 18844.
27. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 37.
28. Coelho MB, Cabral JMS, Karp JM. Intraoperative Stem Cell Therapy. *Annu Rev Biomed Eng* 2012; 14: 325-349.
29. Taketani T, Oyama C, Mihara A et al. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells with Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in Infants with Severe Hypophosphatasia. *Cell Transplant* 2015; 24: 1931-1943.
30. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2015; 99: 1681-1690.
31. Sanchez M, Delgado D, Sanchez P et al. Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma for Severe Knee Osteoarthritis: A Pilot Study. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 4868613.
32. Lin Wong K, Boon Leng Lee K, Choo Tai B et al. Injectable Cultured Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Varus Knees With Cartilage Defects Undergoing High Tibial Osteotomy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial With 2 Years' Follow-up. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 2013; 29: 2020-2028.
33. Pers Y-MM, Rackwitz L, Ferreira R et al. Consortium, Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5: 847-856.
34. Orozco L, Munar A, Soler R et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplant J* 2013; 95: 1535-1541.
35. Freitag J, Ford J, Bates D et al. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections. *BMJ Open* 2015; 5: e009332.
36. Jo CH, Lee YG, Shin WH et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014; 32: 1254-1266.
37. Davatchi F, Sadeghi Abdollahi BS, Mohyeddin M et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *Int J Rheum Dis* 2016; 19: 219-225.
38. Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 2011; 14: 211-215.
39. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2015; 99: 1681-1690.

40. Centeno CJ, Busse D, Kisdaj J et al. Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician* 2008; 11: 343-353.
41. Vangsnest CT, Farr J, Boyd J et al. Adult Human Mesenchymal Stem Cells Delivered via Intra-Articular Injection to the Knee Following Partial Medial Meniscectomy. *J Bone Jt Surgery-American Vol* 2014; 96: 90-98.
42. Centeno CJ, Al-Sayegh H, Bashir J et al. A prospective multi-site registry study of a specific protocol of autologous bone marrow concentrate for the treatment of shoulder rotator cuff tears and osteoarthritis. *J Pain Res* 2015; 8: 269-276.
43. Akgun I, Unlu MC, Erdal OA et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2015; 135: 251-263.
44. Koh YG, Kwon OR, Kim YS et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthroscopy* 2016; 32: 97-109.
45. Lee SY, Kim W, Lim C et al. Treatment of lateral epicondylitis by using allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells: a pilot study. *Stem Cells* 2015; 33: 2995-3005.
46. Chen C, Qu Z, Yin X et al. Efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head: A three-year follow-up study. *Mol Med Rep* 2016; 14: 4209-4215.
47. Cerqueira Daltro G, Fortuna V, Silva De Souza E et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. *Stem Cell Res Ther* 2012; 6: 110.
48. Aoyama T, Goto K, Kakinoki R et al. An Exploratory Clinical Trial for Idiopathic Osteonecrosis of Femoral Head by Cultured Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Augmented with Vascularized Bone Grafts. *TISSUE Eng. Part B.* 2014; 20: 233-242.
49. Rastogi S, Sankineani SR, Nag HL et al. Intralesional autologous mesenchymal stem cells in management of osteonecrosis of femur: A preliminary study. *Musculoskelet Surg* 2013; 97: 223-228.
50. Zhao D, Cui D, Wang B et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone* 2012; 50: 325-330.
51. Weel H, Mallee WH, Van Dijk CN et al. The effect of concentrated bone marrow aspirate in operative treatment of fifth metatarsal stress fractures; a double-blind randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2015; 16: 211.
52. Kim SJ, Song DH, Park JW et al. Effect of Bone Marrow Aspirate Concentrate-Platelet-Rich Plasma on Tendon-Derived Stem Cells and Rotator Cuff Tendon Tear. *Cell Transplant* 2017; 26: 867-878.
53. Reissis D, Tang QO, Cooper NC et al. Current clinical evidence for the use of mesenchymal stem cells in articular cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16: 535-557.
54. Mardones R, Via AG, Jofré C et al. Cell therapy for cartilage defects of the hip. *Muscles Ligaments Tendons J* 2016; 6: 361-366.
55. Kon E, Roffi A, Filardo G et al. Scaffold-based cartilage treatments: With or without cells? A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* 2015; 31: 767-775.
56. Deng Z, Jin J, Zhao J et al. Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 9201492.
57. Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M et al. Clinical Use of Bone Marrow, Bone Marrow Concentrate, and Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Disease. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 181-192.
58. Merlos-Suá Rez A, Barriga FM, Jung P et al. The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 511-524.
59. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW et al. Age-Related Intrinsic Changes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Osteoblasts. *Aging Cell* 2008; 7: 335-343.
60. Gunawardene P, Bermeo S, Vidal C et al. Association Between Circulating Osteogenic Progenitor Cells and Disability and Frailty in Older Persons: The Nepean Osteoporosis and Frailty Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71: 1124-1130.
61. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 35-43.
62. Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L et al. The Transcriptional Profile of Mesenchymal Stem Cell Populations in Primary Osteoporosis Is Distinct and Shows Overexpression of Osteogenic Inhibitors. *PLoS One.* 2012; 7: e45142.
63. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J et al. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9: 61-71.
64. Marc J, Ostanek B, Kranjc T. Bone microRNAs and aging. *Curr Pharm Biotechnol* 2017; 18: 210-220.
65. Heilmeyer U, Hackl M, Skalicky S et al. Serum miRNA Signatures Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women With and Without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *J Bone Miner Res* 2016; 31: 2173-2192.
66. Edwards MH, Ward KA, Ntani G et al. Lean mass and fat mass have differing associations with bone microarchitecture assessed by high resolution peripheral quantitative computed tomography in men and women from the Hertfordshire Cohort Study Europe PMC Funders Group. *Bone* 2015; 81: 145-151.
67. Doles JD, Olwin BB. The impact of JAK-STAT signaling on muscle regeneration. *Nat Med* 2014; 20: 1094-1095.
68. Snijders T, Verdijk LB, van Loon LJC. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 328-338.
69. Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med* 2016; 50: 109-117.
70. Musarò A. The Basis of Muscle Regeneration. *Adv Biol* 2014; 2014: 1-16.
71. Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1078686.
72. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* 2015; 21: 1455-1463.
73. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 11-19.

