

MEZENCHYMÁLNE STROMÁLNE BUNKY A ICH VYUŽITIE V CHIRURGII

*MUDR. KATARÍNA SZABÓMIHÁLYOVÁ 1, PROF. MUDR.
MARIAN VIDIŠČÁK, PHD., MPH1, FEBPS, DR. H. C. PROF.
MUDR. ŠTEFAN DURDÍK, PHD., MHA, MPH2*

*1. IV. CHIRURGICKÁ KLINIKA LFUK A UNB RUŽINOV, 2.
KLINIKA ONKOLOGICKEJ CHIRURGIE LFUK A OÚSA*



DEFINÍCIA

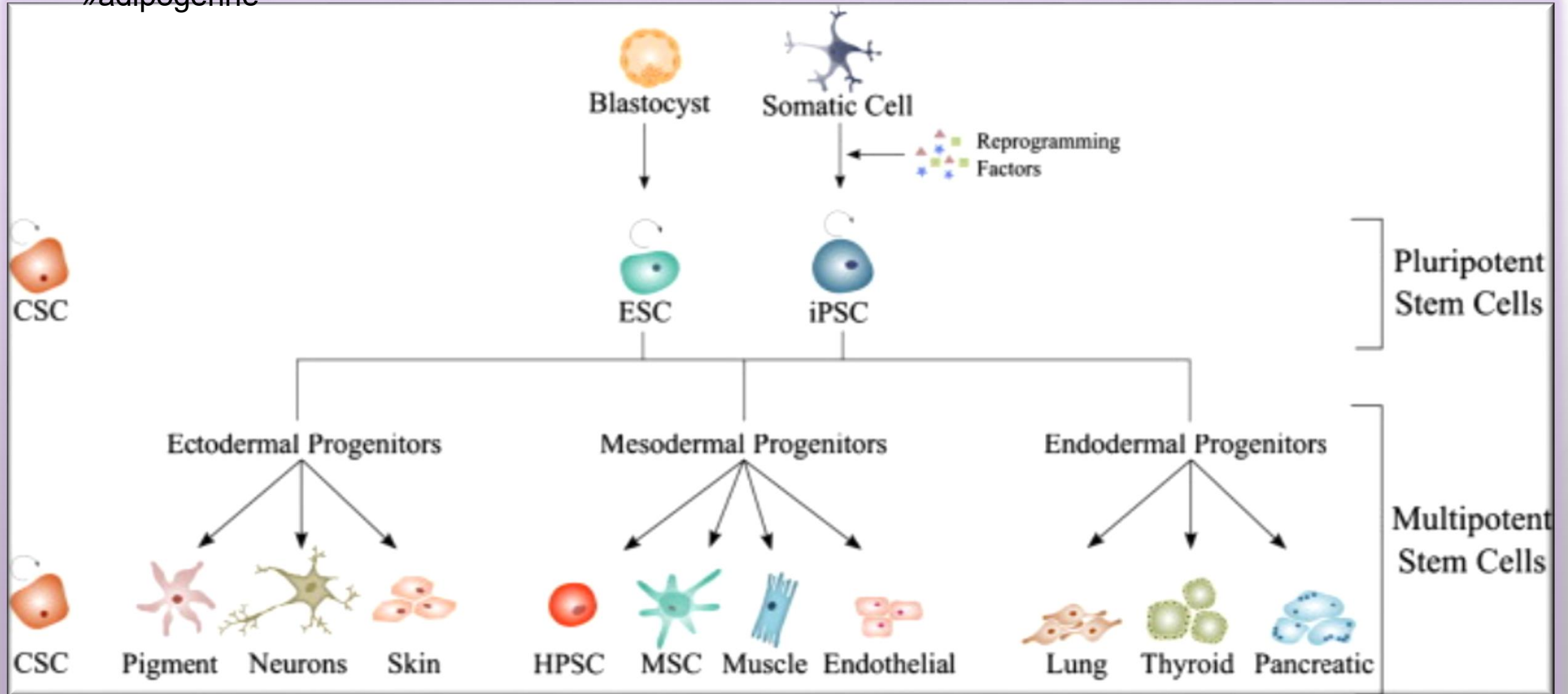
Mezenchymálne stromálne bunky sú multipotentné kmeňové bunky, ktoré sú schopné sa správať:

»Osteogénne
»adipogénne

»chondrogénne

»neurogenénne

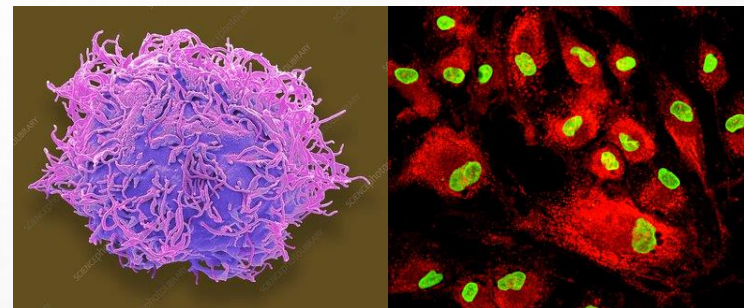
»myogénne



- Mezenchymálne stromálne bunky (MSC) je termín označujúci rad nediferencovaných multipotentných buniek dospelých jedincov

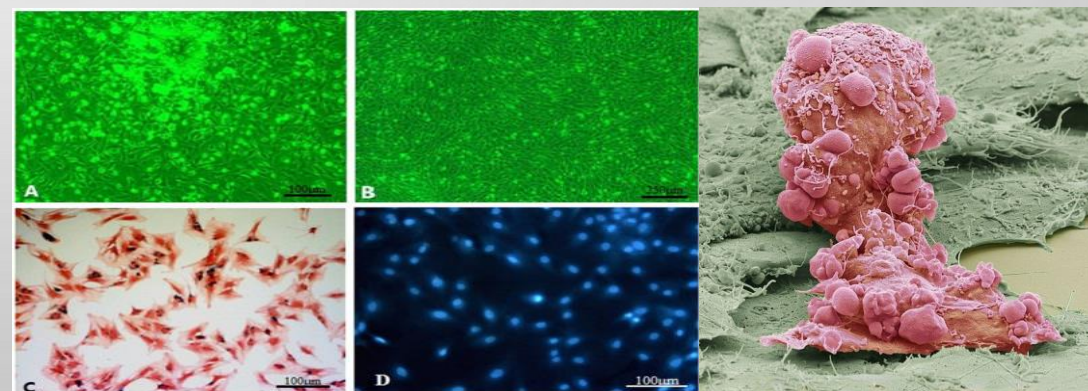
- Sú to bunky:

- ❖ s vysokou plasticitou, podobné fibroblastom
- ❖ vykazujú jasné vlastnosti samoobnovy
- ❖ schopné diferencovať sa in vitro do podoby buniek mezenchymálnej línie (ak sú adekvátne kultivované v selektívnych médiách za špecifických indukčných podmienok)



- Terapia založená na MSC je dnes jedným z najmodernejších a najpopulárnejších smerov v lekárskom výskume

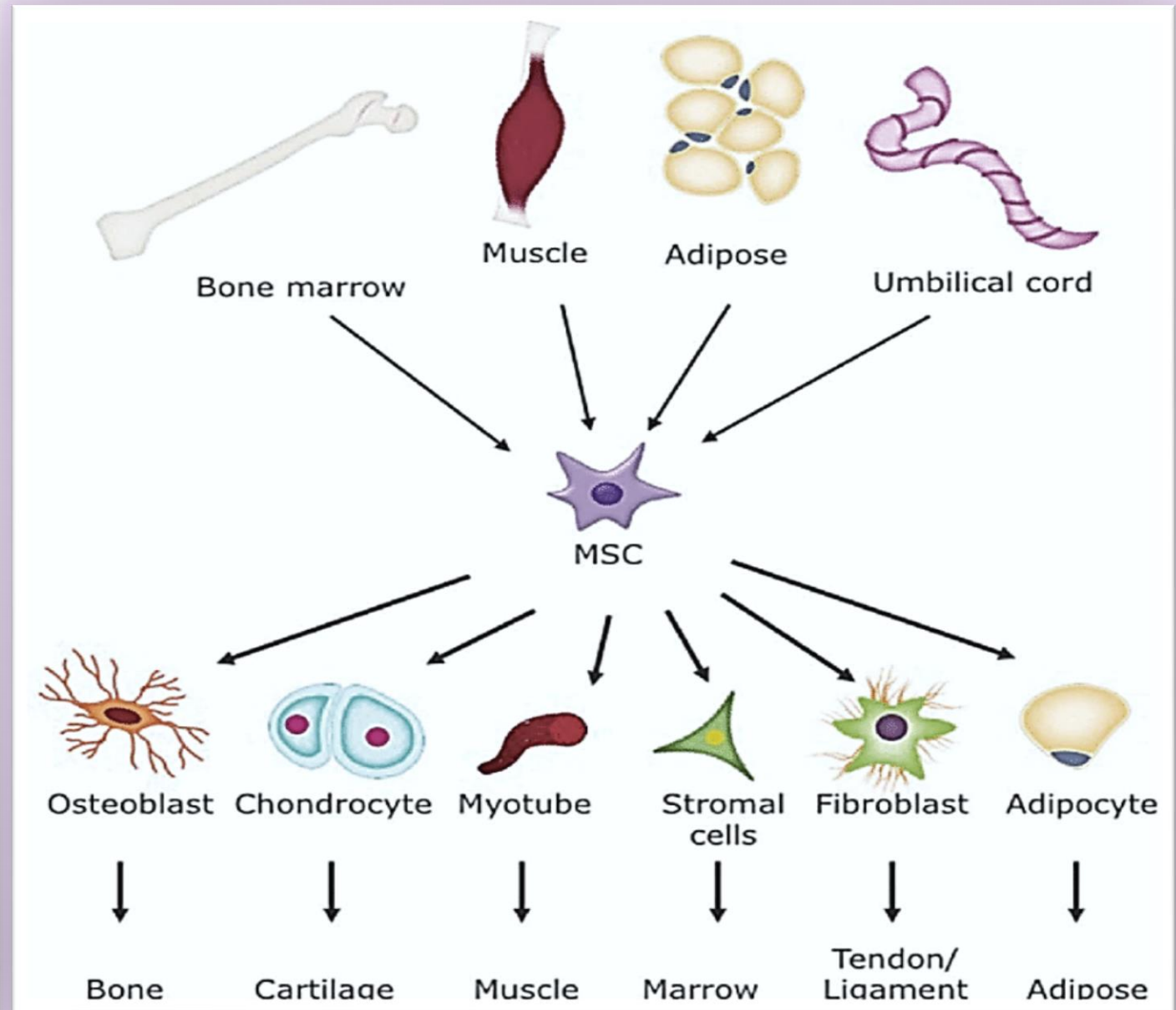
- Autológne vs alogénne



MSC MOŽNO ZÍSKAŤ Z VIACERÝCH

ZDROJOV, AKO :

- Tukové tkanivo
- Zubná dreň
- Pupočná šnúra
- Placenta
- Choriové klky
- Plodová voda
- Whartonov rôsol
- Pupočníková krv
- Periférna krv
- Menštruačná krv
- Materské mlieko
- Endometrium
- Vajíčkovody
- Pečeň
- Týmus
- Rohovka
- Mozgové tkanivo
- Periost
- Synoviálna tekutina
- Šľachy
- Slezina
- Koža
- Potné žľazy
- Nosová sliznica
- Koža
- Pľúcne tkanivo



a ďalších

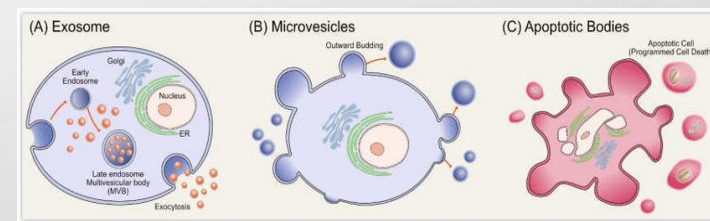
Immunomodulačné schopnosti kultivovaných MSC

MSCs pôsobia na adaptívny aj vrodený imunitný systém ovplyvnením:

- aktivity T buniek,
- dozrievania dendritických buniek,
- aktivácie a proliferácie B buniek,
- proliferácie a cytotoxicity NK buniek
- tvorby regulačných T buniek prostredníctvom IL-10

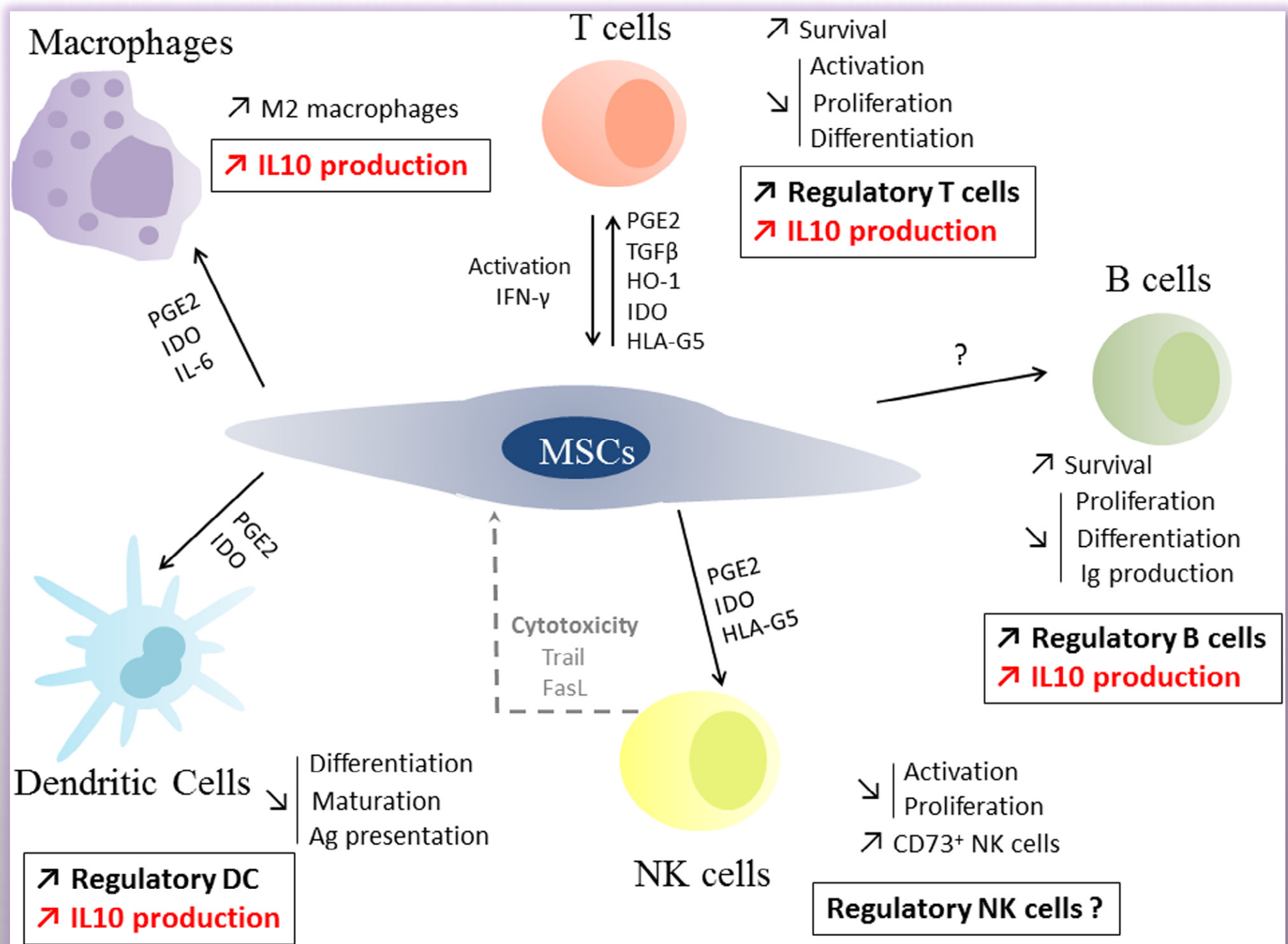
MSCs sprostredkujú tieto procesy:

- Parakrinne - tvorba chemokínov a cytokínov
- Pomocou extracelulárnych vezikulov
- Supresiou T buniek – indolamín 2,3-dioxygenáza „IDO“
 - Jednou z nových oblastí výskumu sú štúdie Toll-like receptorov (TLR) na MSC



Účinky MSC

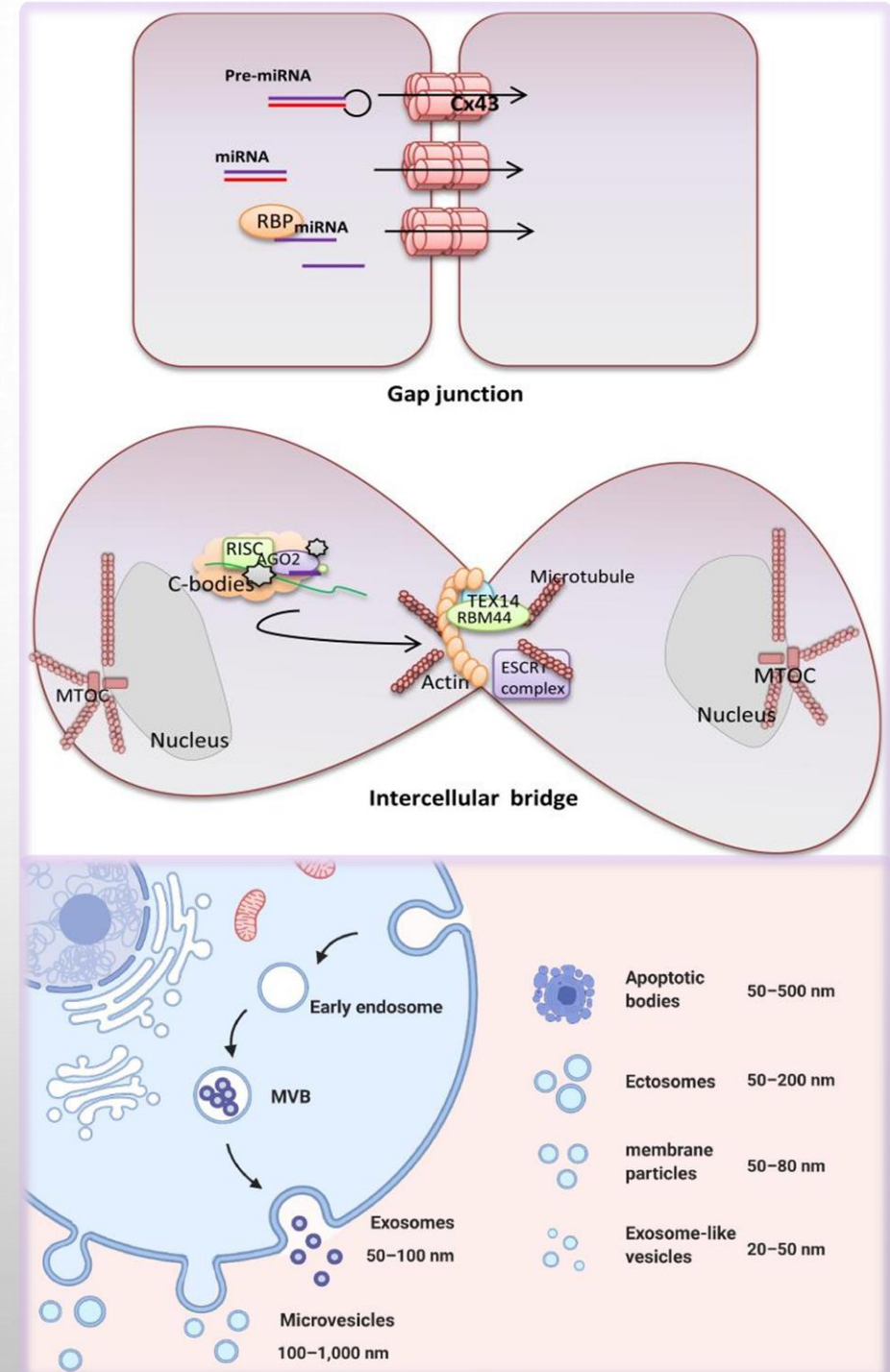
- **parakrinné a endokrinné účinky t.j. vylučovanie viacerých rozpustných mediátorov, ako:**
 - rastové faktory
 - protizápalové cytokíny
 - antimikrobiálne peptidy
- **zvyšujú fagocytárnu aktivitu monocytov**
- **modulujú zápalovú aktivitu podporou tvorby:**
 - protizápalového fenotypu makrofágov (M2 bunky)
 - regulačných T-lymfocytov
 - regulačných B-lymfocytov
- **znižujú aktivitu a proliferáciu prozápalových buniek**
- **redukujú fibrotickú remodeláciu:**
 - redukciou obsahu kolagénových vlákien,
 - zvýšením expresie metaloproteinázy-8
 - potlačením expresie tkanivového inhibítora metaloproteinázy-1

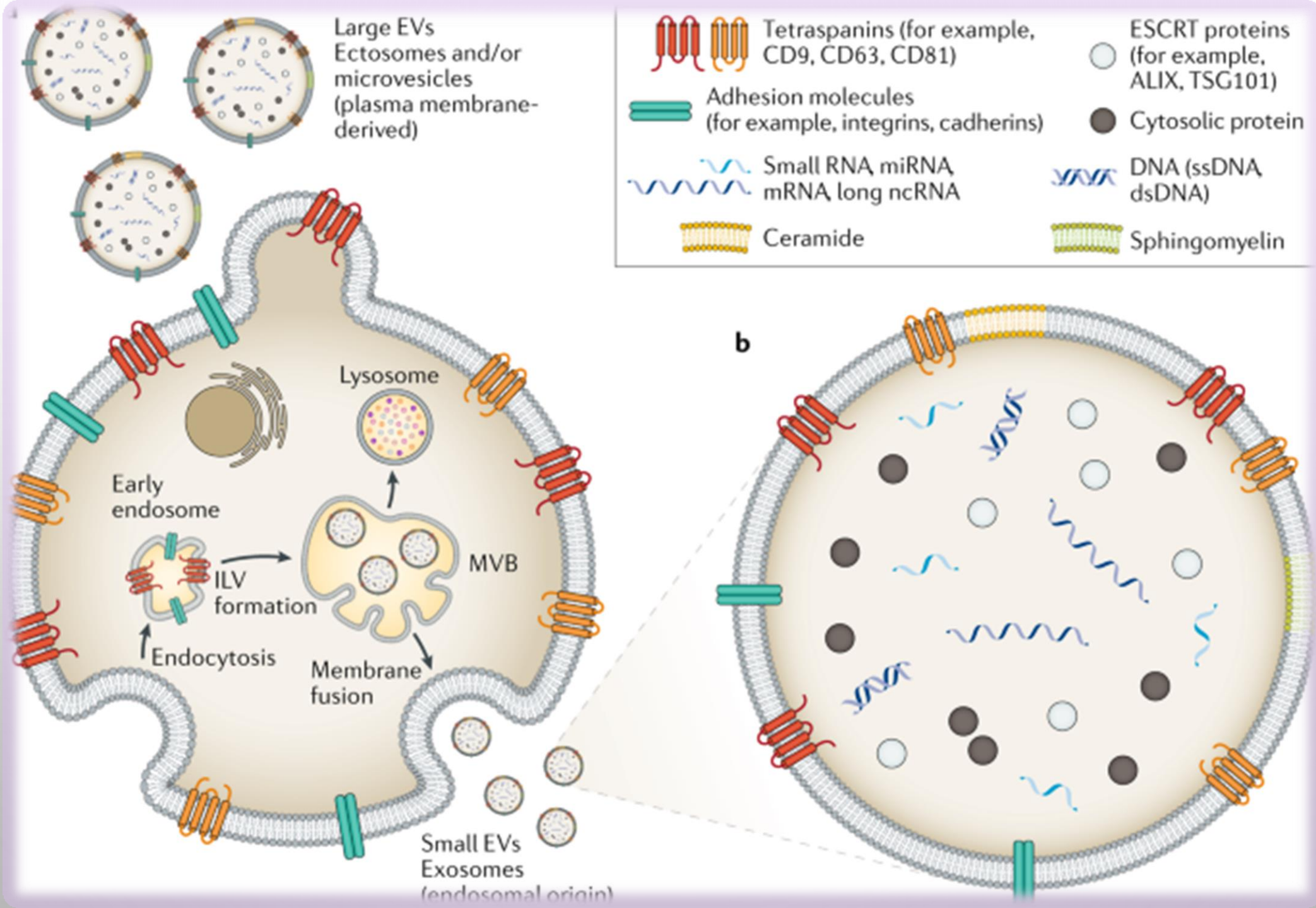


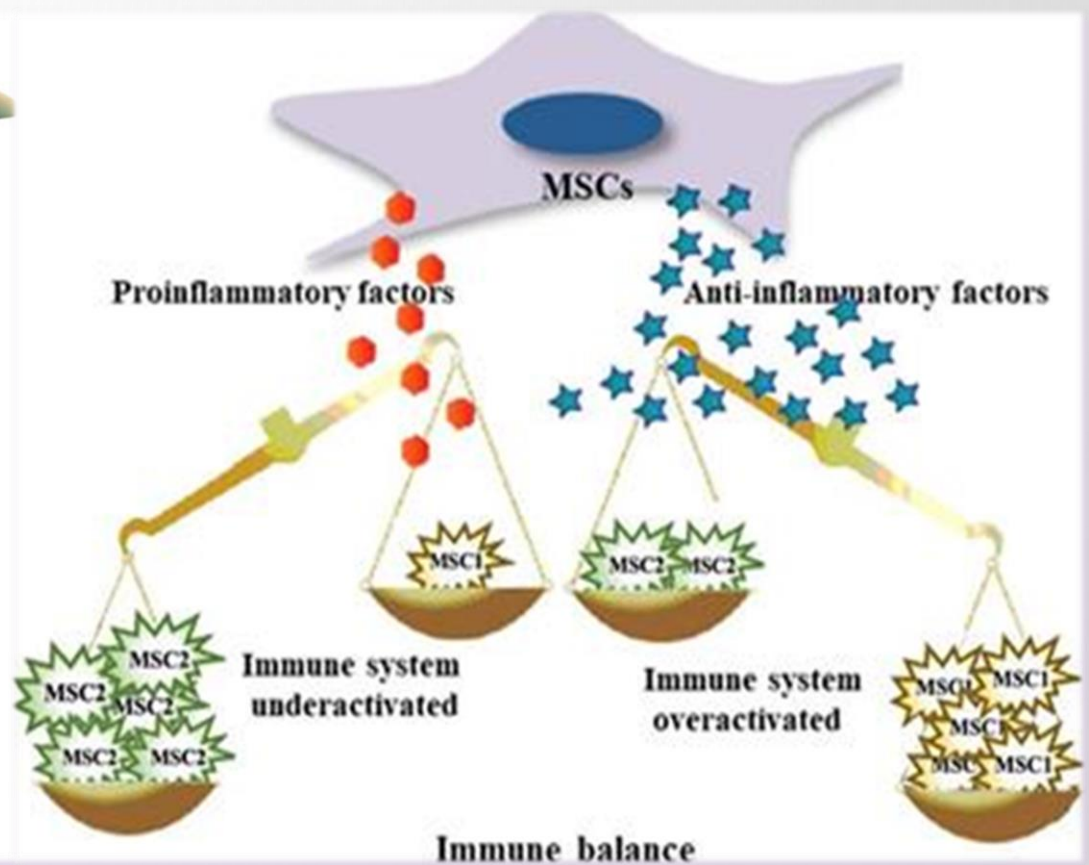
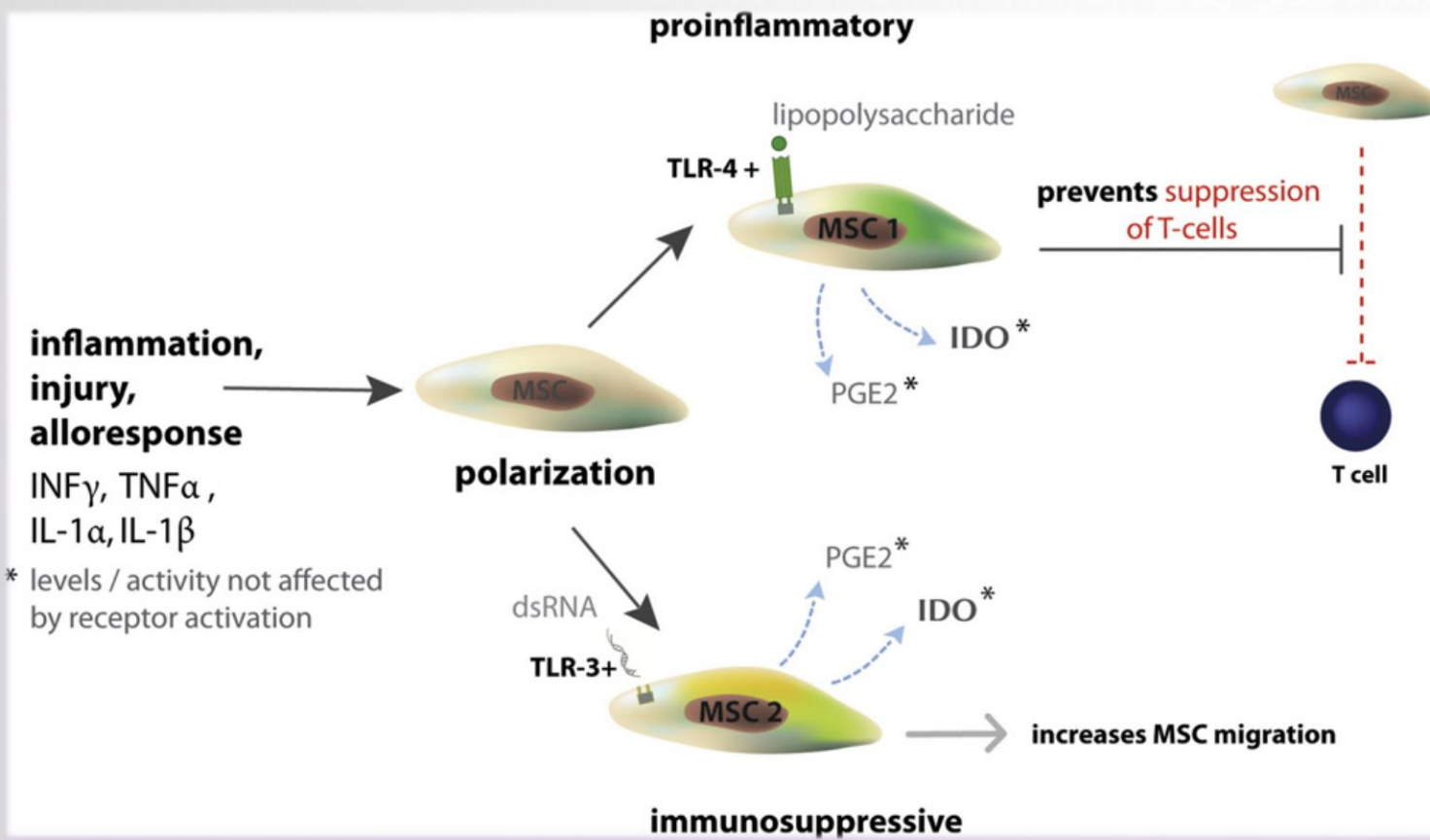
MECHANIZMY POTLÁČANIA ZÁPALU

Viacerých dráhy účinku, a to pomocou:

- Medzibunkového kontaktu
- Prenosu organel (priamy prenos mitochondrií pomocou medzibunkových mostíkov sprostredkovaných konexínom 43 alebo pomocou extracelulárnych vezikúl)
- Uvoľnenia rozpustných mediátorov alebo extracelulárnych vezikúl

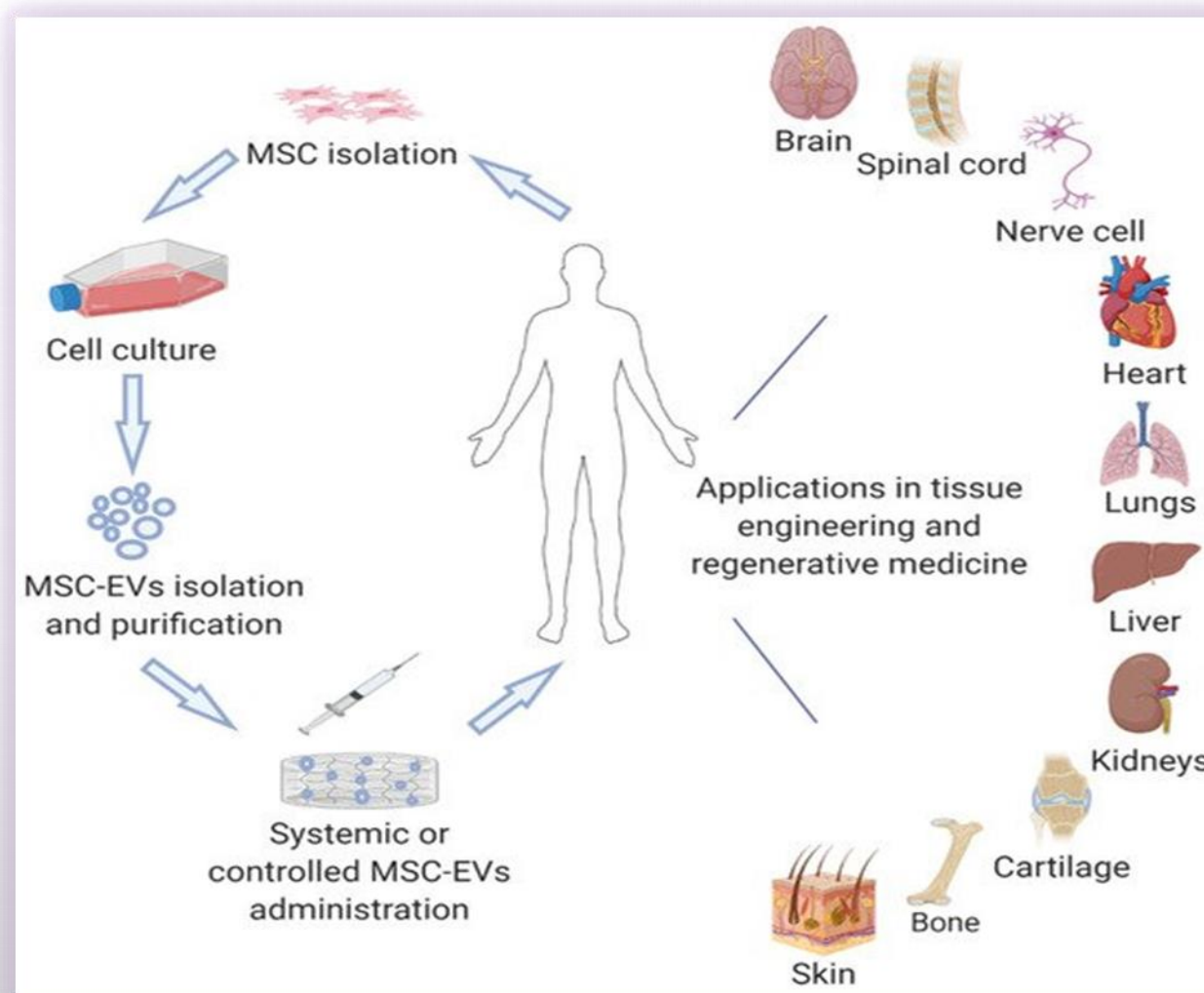


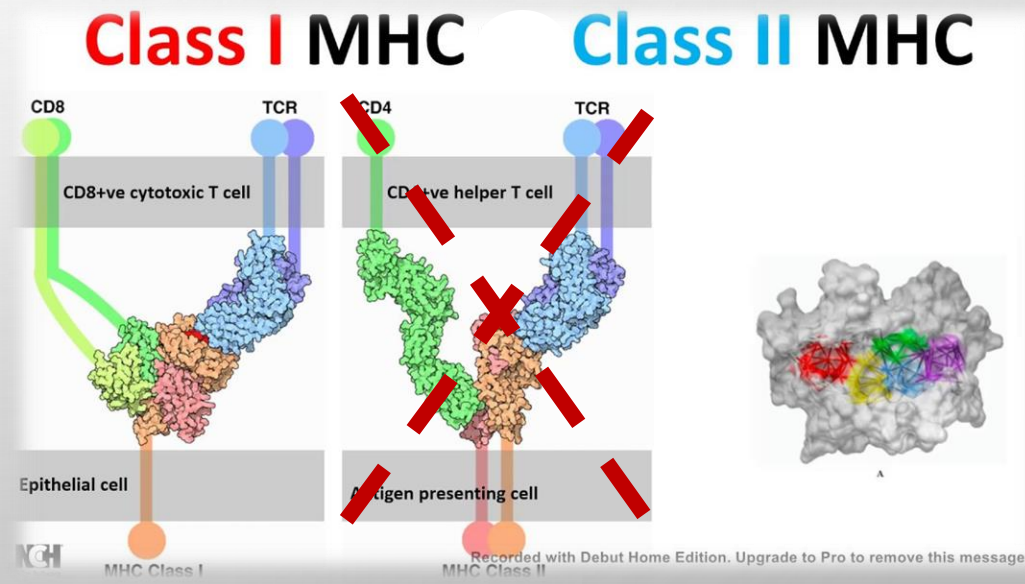
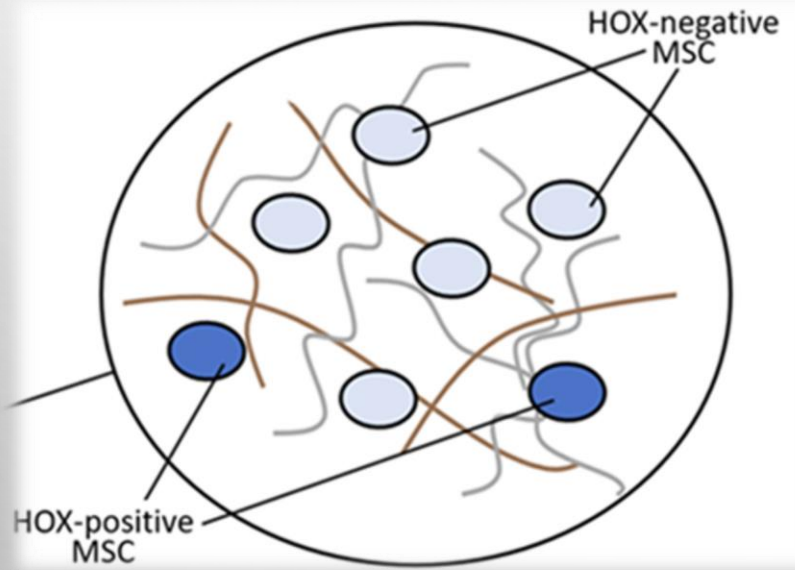
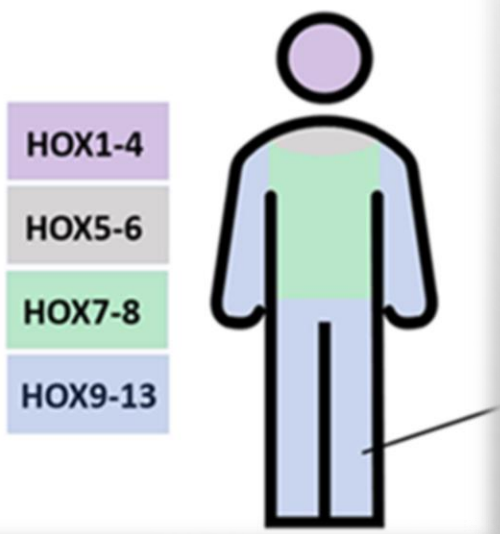
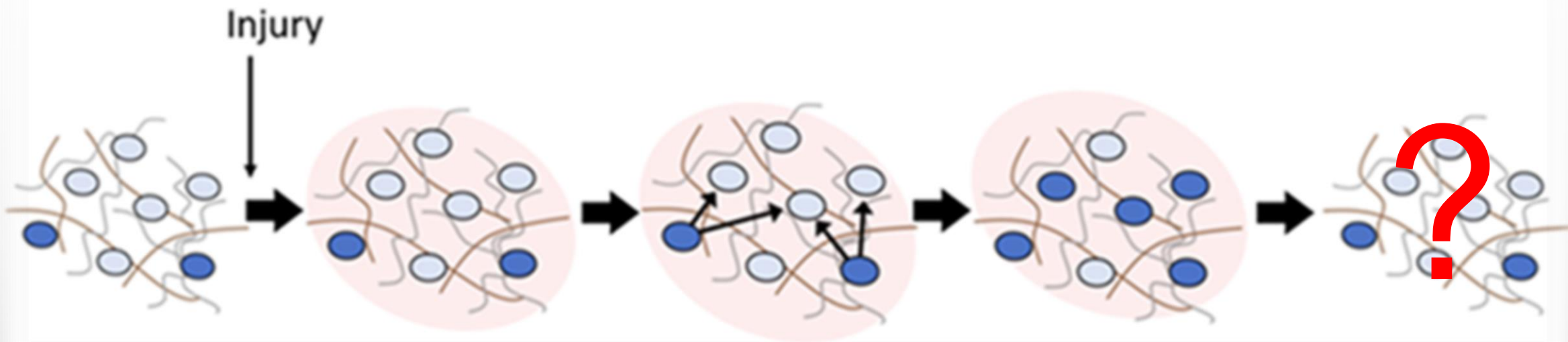




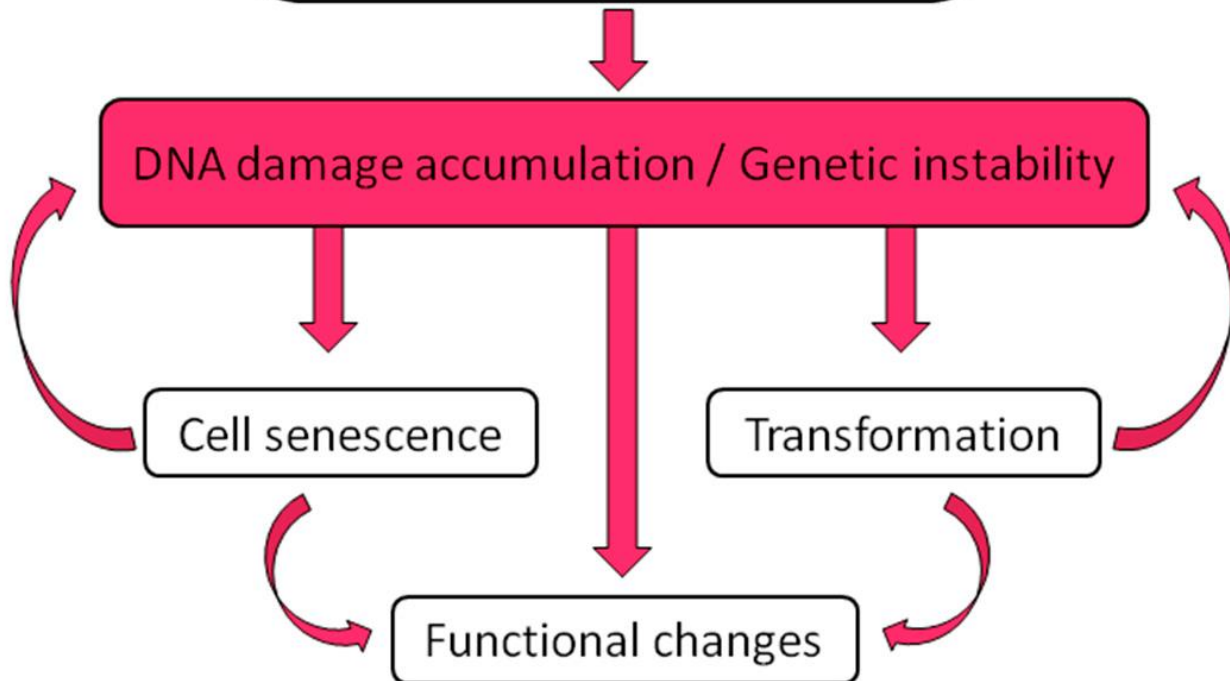
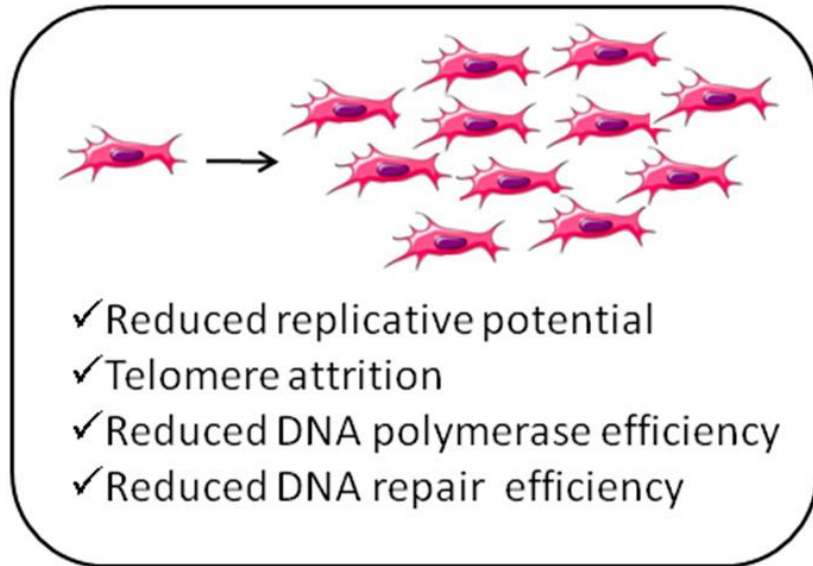
MOŽNOSTI APLIKÁCIE

- priama schopnosť regenerácie tkaniva - tkanivových náhrady:
 - kultivačne
 - prostredníctvom biotlače
- nepriame pôsobenie:
 - protizápalového a imuno-modulačného účinku
 - sekrécia extracelulárnych vezikúl (EV)
- MSC ako vektorov na dodávanie liekov „drug loading and delivery“ (hlavne protirakovinových)

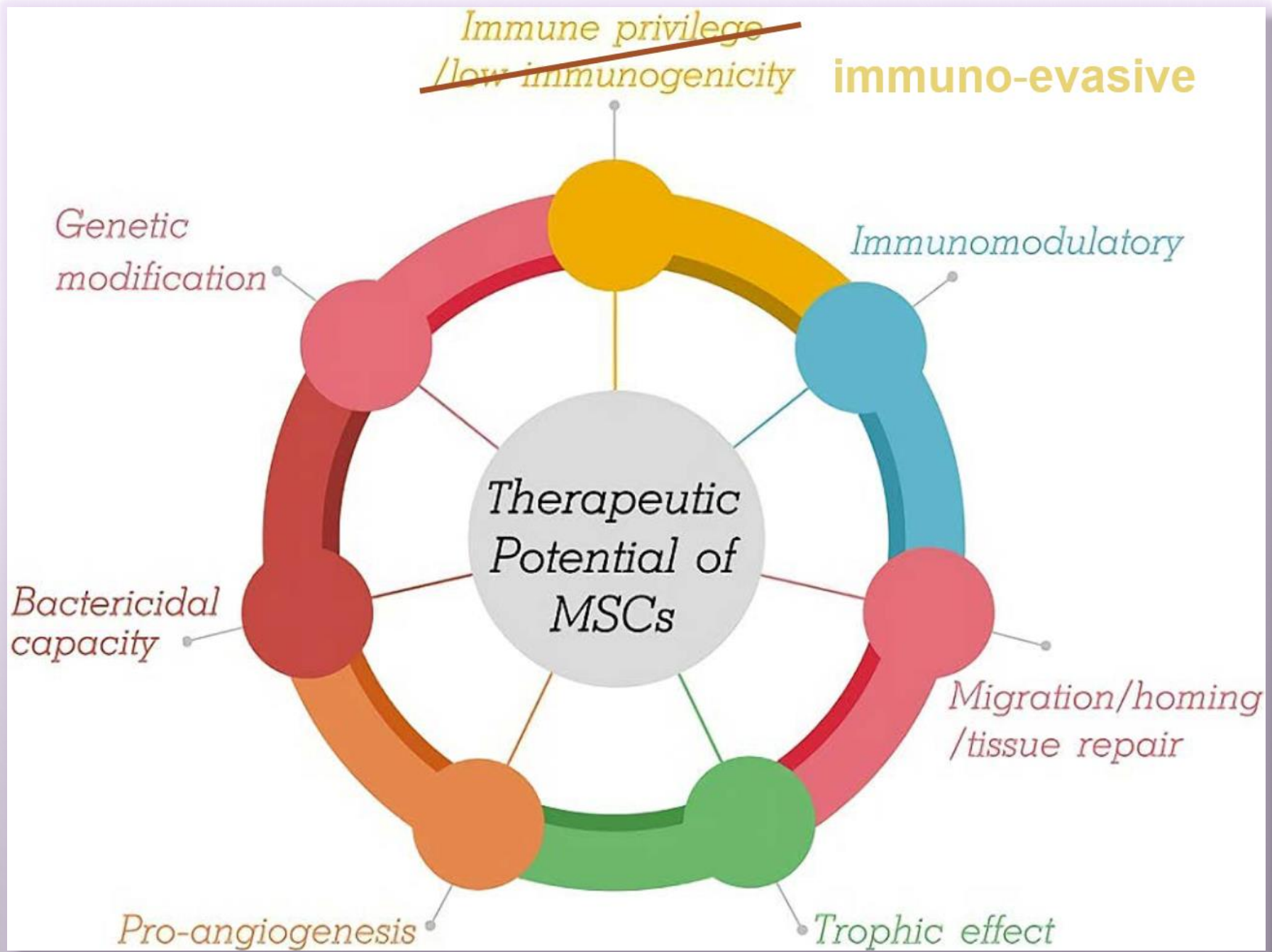




In vitro expansion



- Frekvencia MSC v tkanivách dospelého človeka je nízka:
 - ❖ približne $1/10^6$ buniek v kostnej dreni
 - ❖ Výskyt je 100–1000-krát vyšší v tkanivách pupočnej šnúry a v tukovom tkanive
- Ex vivo kultivácia je preto skoro vždy potrebná na získanie dostatočného počtu buniek
- Kultivácia má ale svoje špecifické nevýhody z hľadiska:
 - genetickej stability
 - „starnutia buniek“ - zníženie proliferatívnych, diferenciačných, homingových, imunomodulačných vlastností
 - objavenie sa transformačného sekrečného fenotypu súvisiaceho so starnutím



ÚSKALIA A NÚ TERAPIE

- Pri podaní MSC intravenózne 80% bunkovej nálože sa vychytáva v pľúcach v priebehu 3-7 minút
- Viabilné bunky sa dajú dokázať v tele príjemcu iba do jedného týždňa po podaní. Dokázal sa tiež tropizmus MSC k zapáleným alebo poraneným miestam a k nádorovým tkanivám
- Rozdielne výsledky jednotlivých štúdií
- In vivo štúdie primárnych MSC (MSC in situ) stále chýbajú:
 - Nízka frekvencia primárnych MSC in vivo
 - Nedostatok vhodných zvieracích modelov
 - Značné medzidruhové rozdiely v mechanizmoch účinku
- MSC sú relatívne veľké bunky (priemerná veľkosť 30 μm pri „bežnej“ monovrstvovej kultivácii za 2D podmienok), čím sa vysvetľuje, že pri niektorých zvieracích experimentoch sa vyskytli tromboembolické komplikácie
- dôležitosť sledovania perzistencie exogénnych MSC in vivo
- nedostatok publikácií popisujúcich dlhodobé sledovanie recipientov
- Zvýšenú pozornosť treba venovať aj interakciám MSC s rakovinovými bunkami
- extracelulárne vezikuly odvodené od MSC



ÚSKALIA A NÚ TERAPIE

Osobitná pozornosť by sa mala venovať:

- Kultivačným podmienkam a médiám
- Saturácii kyslíka
- Kryokonzervačnému postupu a časovému odstupu od rozmrazenia po podanie
- Tkanivovému zdroju a subpopuláciám MSC
- „Primingu“ (označkovanie MSC terapeutickou látkou alebo za účelom sledovania in vivo) alebo aktivácie pred podaním
- Použitiu génovo modifikovaných alebo nemodifikovaných buniek
- Použitiu autológnych alebo alogénnych buniek
- spôsobu podania
- Terapeutickej dávke
- Sledovaniu perzistencie exogénnych MSC



MSC
transplantation



Neurology

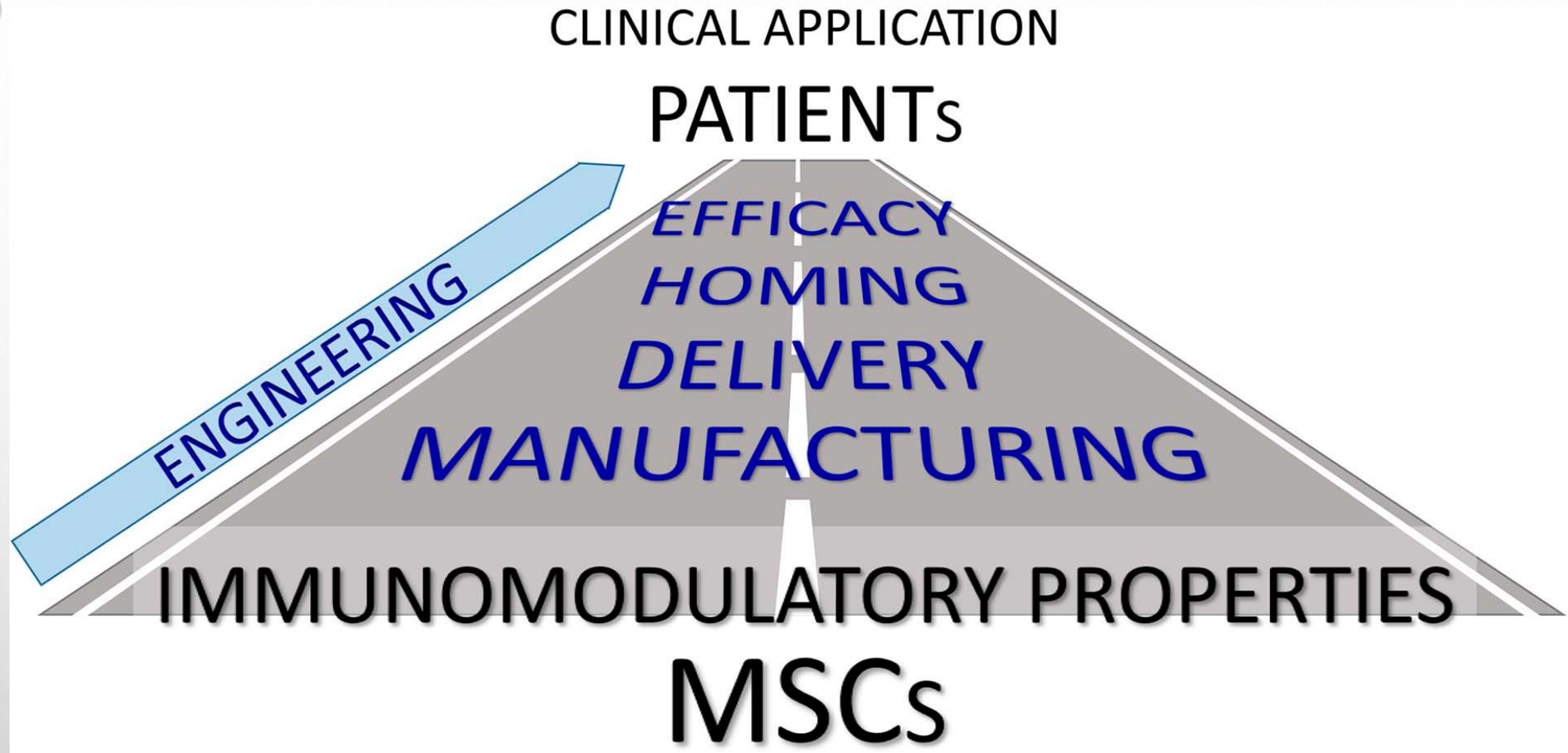
Cardiology

GVHD

Orthopedics

Potential risks of MSC therapy

- (i) Pro-tumorigenic
- (ii) Immune response
- (iii) Disturbed differentiation capacities
- (iv) Differentiation into undesirable tissue
- (v) Short survival after implantation
- (vi) Not spectacular improvements
- (vii) Unspecified optimal doses and route of cell administration



- MSC sú schopné pri intravenózne aplikácii špecificky migrovať smerom k TU novotvarom a ich MTS
- Tento zvláštny rakovinový tropizmus otvoril nové pole na použitie mscs ako vektorov na dodávanie antineoplastických liekov pre ciele terapie

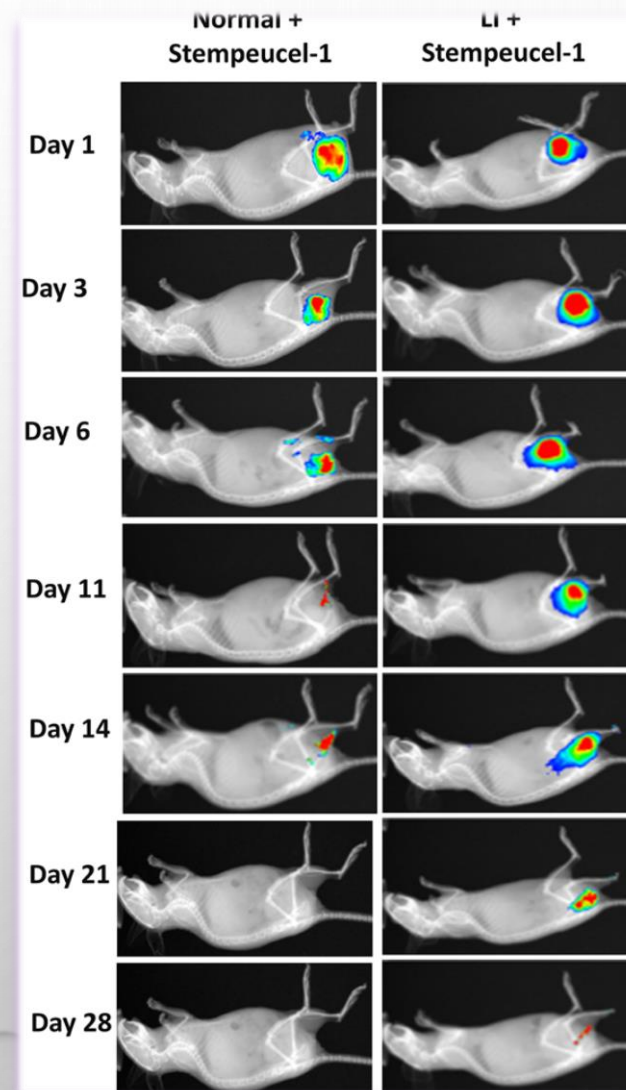
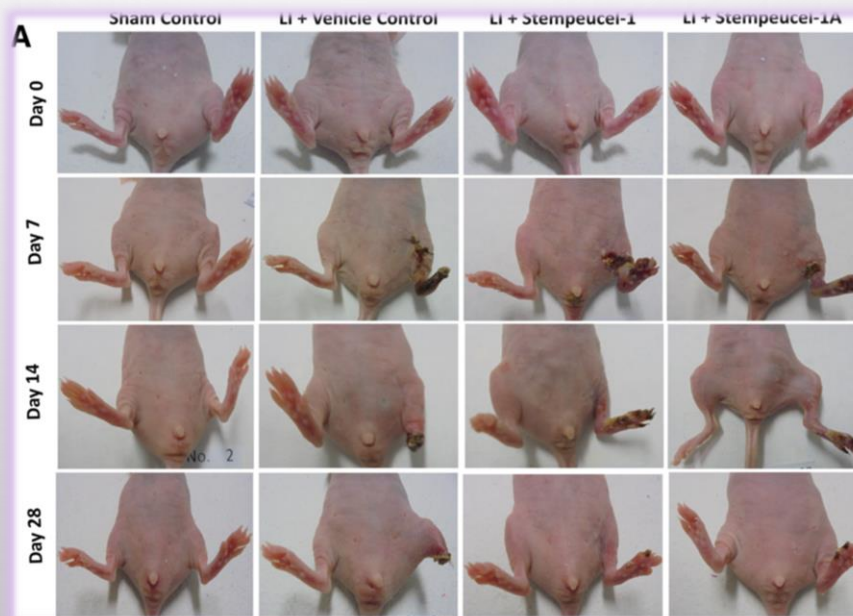
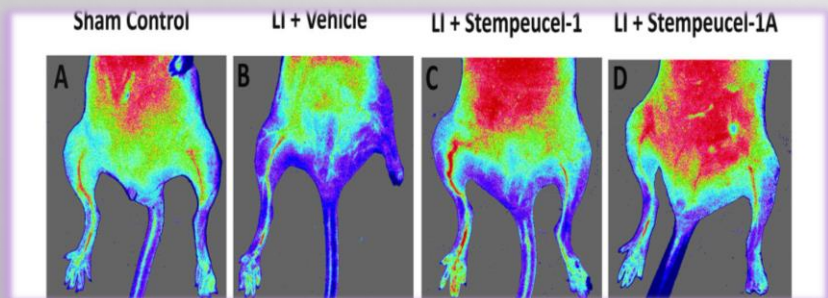
- MSC SÚ SÚČASNE POUŽÍVANÉ V KLINICKÝCH ŠTÚDIÁCH PRE VEĽKÝ POČET RÔZNYCH CHORÔB
- VIACERÉ BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLOČNOSTI SÚ VO FÁZE II A III TESTOVANIA V SNAHE O KOMERCIALIZÁCIU SVOJICH BUNKOVÝCH PRÍPRAVKOV

- NIEKTORÉ PRÍPRAVKY:
 - PROCHYMAL (PREDTÝM OSIRIS THERAPEUTICS INC. TERAZ MESOBLAST)
 - REVASCOR (MESOBLAST)
 - MULTISTEM (ATHERSYS)
 - STEM DYNE-MSC (STEMEDICA)
 - AC607 (ALLOCURE)
 - CX601 ALEBO DARVADSTROCEL (ALLOCURE)
 - STEMPEUCEL (STEMPEUTIC)
 - TRINITY EVOLUTION (ORTHOFIX)

MSC A ISCHEMICKÉ POŠKODENIE TKANÍV

MSC A KRITICKÁ KONČATINOVÁ ISCHÉMIA

- I.M. INJEKCIA KONCENTROVANÉHO ASPIRÁTU KOSTNEJ DRENE (cBMA), KTORÝ OBSAHUJE PHC A MSC, SA UKÁZALA AKO SĽUBNÁ AJ VO VEĽKÝCH RANDOMIZOVANÝCH KONTROLOVANÝCH ŠTÚDIÁCH
- THEJ ET AL. V IN VITRO AJ IN VIVO ŠTÚDIÁCH DOKÁZALI, ŽE STEMPEUCEL®-1 PODANÝ INTRAMUSKULÁRNE (I.M.) ZMIERNIL NEKRÓZU KONČATÍN A ZLEPŠIL FUNKCIU KONČATÍN ZA 28 DNÍ.
- WANG ET AL. - INTRAMUSKULÁRNA APLIKÁCIA INJEKCIE ALOGÉNNYCH MSC (CHAMP) ALEBO AUTOLÓGNEHO cBMA (MALLOWCHAMP)
- SORIA-JUAN ET AL. - THE NOMA TRIAL



MSC A ISCHEMICKÉ POŠKODENIE TKANÍV

MSC A ISCHEMICKÉ POŠKODENIE ČRIEV

- AKÚTNA MEZENTERICKÁ ISCHÉMIA (AMI) → STARŠIA POPULÁCIA → ÚMRTNOSŤ AŽ 40 %
- NEKROTIZUJÚCA ENTEROKOLITÍDA (NEC) + VOLVULUS → NOVORODENECKÁ POPULÁCIA

MARKEL ET AL. VYKONALI IN VITRO AJ IN VIVO ŠTÚDIE. NA 8 AŽ 12 TÝŽDŇOVÝCH MYŠIACH:

- ISCHÉMIA SA VYVOLALA DOČASNÝM PODVIAZANÍM ARTERIA MESENTERICA SUPERIOR NA 60 MINÚT (I/R – ISCHEMICKO-REPERFÚZNE POŠKODENIE).
- IHNEĎ PO NAVODENÍ ISCHÉMIE SA NIEKTORÝM MYŠIAM PODALI MSC ALEBO KERATINOCYTY (KONTROLA) INTRAPERITONEÁLNE
- ZVIERATÁ SA POTOM NECHALI ZOTAVIŤ 6 HODÍN (MOLEKULÁRNA/HISTOLOGICKÁ ANALÝZA) ALEBO 7 DNÍ (ANALÝZA PREŽITIA)

VÝSLEDOK:

- ZNÍŽENIE MORTALITY I/R ZO 70 % NA 10 % DÁVKOVO ZÁVISLÝM SPÔSOBOM (P = 0,004)
- HISTOLOGICKÉ NÁLEZY SA NEZLEPŠILI!
- ZNÍŽILA MORTALITU I/R U MYŠÍ O 60 % PRAVDEPODOBNE MODULÁCIU SYSTÉMOVEJ ZÁPALOVEJ ODPOVEDE NA ISCHÉMIU

MSC AKO VEKTORY NA DODÁVANIE (PROTINÁDOROVÝCH) LIEKOV

MSC PRI INTRAVENÓZNOM PODANÍ IN VIVO MAJÚ ŠPECIFICKÝ **NÁDOROVÝ TROPIZMUS** - SÚ SCHOPNÉ **MIGROVAŤ A INTEGROVAŤ SA** DO STRÓMY NÁDORU A VYHLADAŤ MIKROSKOPICKÉ METASTÁZY

- **MSC AKO NOSIČE VÍRUSOVÝCH VEKTOROV** - Cestou adenovírusovej alebo retrovírusovej transdukcie inkorporácia génov pre : IFN- β , IFN- γ , IL-12, IL-24, Ligand TRAIL, „Samovražedných“ génovo/enzýmových systémov, napr. Tymidínkináza vírusu herpes simplex
- **MSC AKO NOSIČE ONKOLYTICKÝCH VÍRUSOV** – Replikácia vírusu v bunkách TU a šírením do okolitých nádorových tkanív: REPLIKATÍVNY ADENOVÍRUS (CRAD), ONKOLYTICKÝ VÍRUS OSÝPOK (MV)
- **MSC AKO NOSIČE NANOČASTÍC S OBSAHOM LIEČIVA** – S naviazaným **DOXORUBICÍNOM** boli schopné sa akumulovať v nádoroch a pomaly uvoľňovať liečivo, pričom sa zachovala vysoká životaschopnosť MSC buniek. Podobne MSC s nanočasticami **PAKLITAXELU**

MSC A CROHNOVA CHOROBA

- SWART ET AL. PREUKÁZALI, ŽE TRANSPLANTÁCIA HSC OBNOVILA IMUNITNÚ TOLERANCIU A ZMIERNILA CD
- WANG ET AL. VYKONALI METAANALÝZU ÚČINNOSTI A BEZPEČNOSTI SC TERAPIE:
 - POROVNALI ODPOVEĎ ZVIERAT MSC MALI PREUKÁZATEĽNÝ TERAPEUTICKÝ ÚČINOK V OBOCH MODELOCH,
 - BM-MSC MALI NAJSILNEJŠÍ TERAPEUTICKÝ ÚČINOK
 - PRI HSC SA VYSKYTLO VIAC NEŽIADUCICH REAKCII, AKO NAPRÍKLAD ZVÝŠENÁ INCIDENCIA VÍRUSOVÝCH INFEKCIÍ
 - ABY SA PREDIŠLO KOMPLIKÁCIÁM U PACIENTOV S CD A PERIANÁLNYM OCHORENÍM JE VHODNÉ VYKONAŤ DRENÁŽ, ZAVIESŤ PRÍSNE HYGIENICKÉ OPATRENIA A PODÁVAŤ ADEKVÁTNU ANTIBIOTICKÚ PROFYLAXIU. UKÁZALO SA, ŽE TIETO OPATRENIA DRAMATICKY ZVÝŠIA BEZPEČNOSŤ.
 - PODÁVANIE MSC ZÍSKANÝCH Z KOSTNEJ DRENE ALEBO Z PUPOČNEJ ŠNÚRY (UC-MSC) BOLO SPOJENÉ S NIŽŠÍM RIZIKOM INFEKCIE A VÄČŠINA VEDĽAJŠÍCH ÚČINKOV BOLA MIERNA A NEBOLA SPOJENÁ S PODÁVANÍM MSC

MSC A CROHNOVA CHOROBA

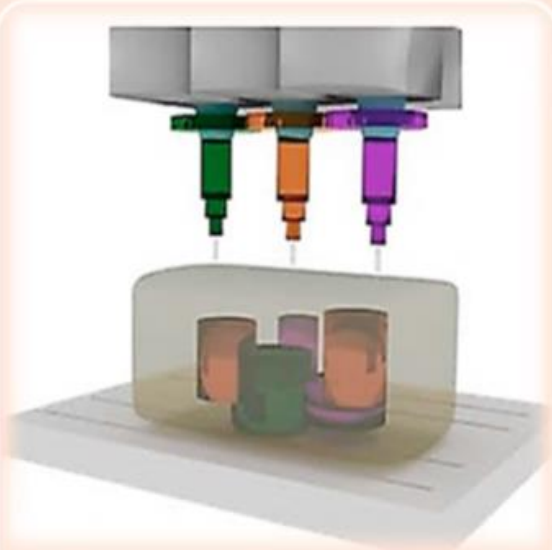
Približne u 20 % pacientov sa vyvinie perianálne fistulujúca forma crohnovej choroby s vysokou rekurenciou po liečbe

- Garcia-Olmo et al. a Panés et al. - Lokálna injekcia MSC zlepšila hojenie perianálnych fistúl súvisiacich s CD
- Suspenzia ľudských alogénnych AD-MSC a využíva sa na liečbu komplexnej pCD
- Veľký počet klinických štúdií preukázalo účinnosť tejto liečby pCD (de la portilla et al., Panés et al.)
- Neda Heidari a kol. a Ju-Hyun An a kol. skúmali vplyv exozómov a prostaglandínu E2 odvodených od AD-MSC
- Silný dôkaz o účinnosti poskytol výstup z randomizovanej, dvojito zaslepenej, placebom kontrolovanej, multicentrickej štúdie (ADMIRE-CD) - pacienti liečení AD-MSC mali vyššiu mieru kombinovanej remisie ako placebo skupina

MSC A TRANSPLANTÁCIA

- MSC pre svoje imunomodulačné účinky sa už dlho testujú, ako **liečba pri GVHD**, ale v súčasnosti sa objavujú aj štúdie ohľadom použitia pri liečbe **HVGD**
- MSC - najslubnejšie spomedzi imunomodulačnými bunkami na bunkovú terapiu **pri transplantácii solídnych orgánov**
- **Casiraghi et al.** Skúmali účinky jednej intravenózne BM-MSC infúzie u príjemcov transplantátu pečene od zosnulého darcu na liečbe nízkou dávkou králičieho antitymocytového globulínu (RATG) a na nízkodávkovej udržiavacej imunosupresívnej liečbe
 - Infúzia BM-MSC podala do 3 hodín pred začatím chirurgického zákroku
 - Zistili zvýšenie percenta Treg. lymfocytov v periférnej krvi počas prvých 2 týždňov po podaní BM-MSC infúzie
 - Tieto zistenia korelovali so podobnými výsledkami niektorých štúdií pri liečbe BM-MSC pri transplantácii obličiek
 - Tento efekt sa nepozoroval v kontrolnej skupine
 - V podobnej štúdií iní bádatelia nepreukázali zvýšenie počtu Treg lymfocytov po infúzia BM-MSC
 - Pri intravenóznom podaní BM-MSC myšiam 2 dni po operácii sa neindukovalo zvýšenie počtu Treg lymfocytov, keď sa myšiam podala infúzia BM-MSC pred transplantáciou, MSC migrovali hlavne do sleziny a podporili proliferáciu Treg lymfocytov.
- **Tieto zistenia by mohli predvídať vývoj pro-tolerogénneho prostredia**

3D BIOTLAČ



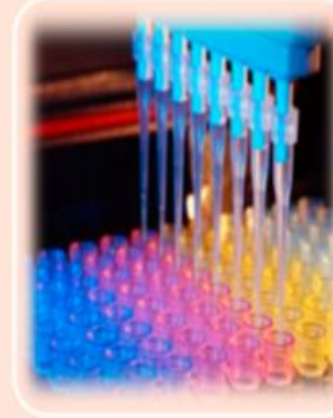
3D Bioprinting



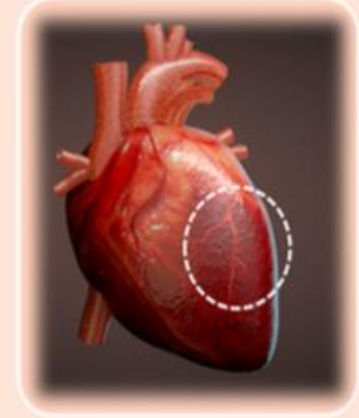
Cancer research



Implantable tissue/organs and devices



Drug and toxicology screening

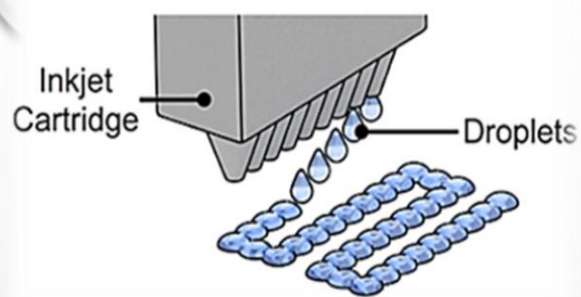


In vitro disease models

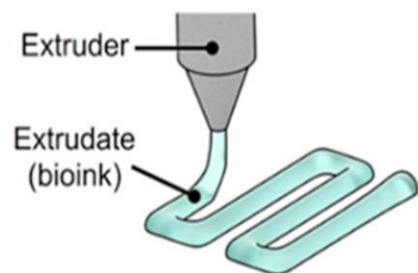


- **3D biotlač** (alebo „robotic additive biomanufacturing“) je špičková technológia
- umožňuje výrobu 3D biologických náhrad na základe **predlôh a vzorov**
- kombinovaním živých a neživých komponentov tvz. „bioatramentov“, vo vopred určenej 3D architektúre
- Bioatramentmi môžu byť:
 - bunkové agregáty („**scaffold-free**“)
 - bunky suspendované v hydrogéle alebo vo viskóznej chemickej látke („**scaffold-based**“)

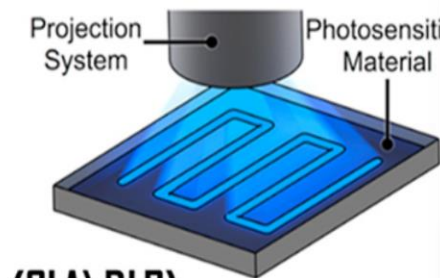
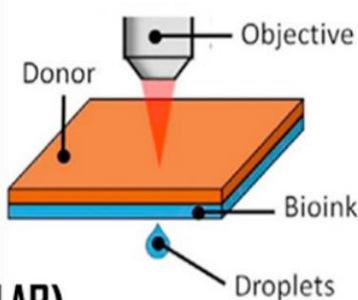
A) Inkjet bioprinter



Microextrusion bioprinter



Light-assisted bioprinters

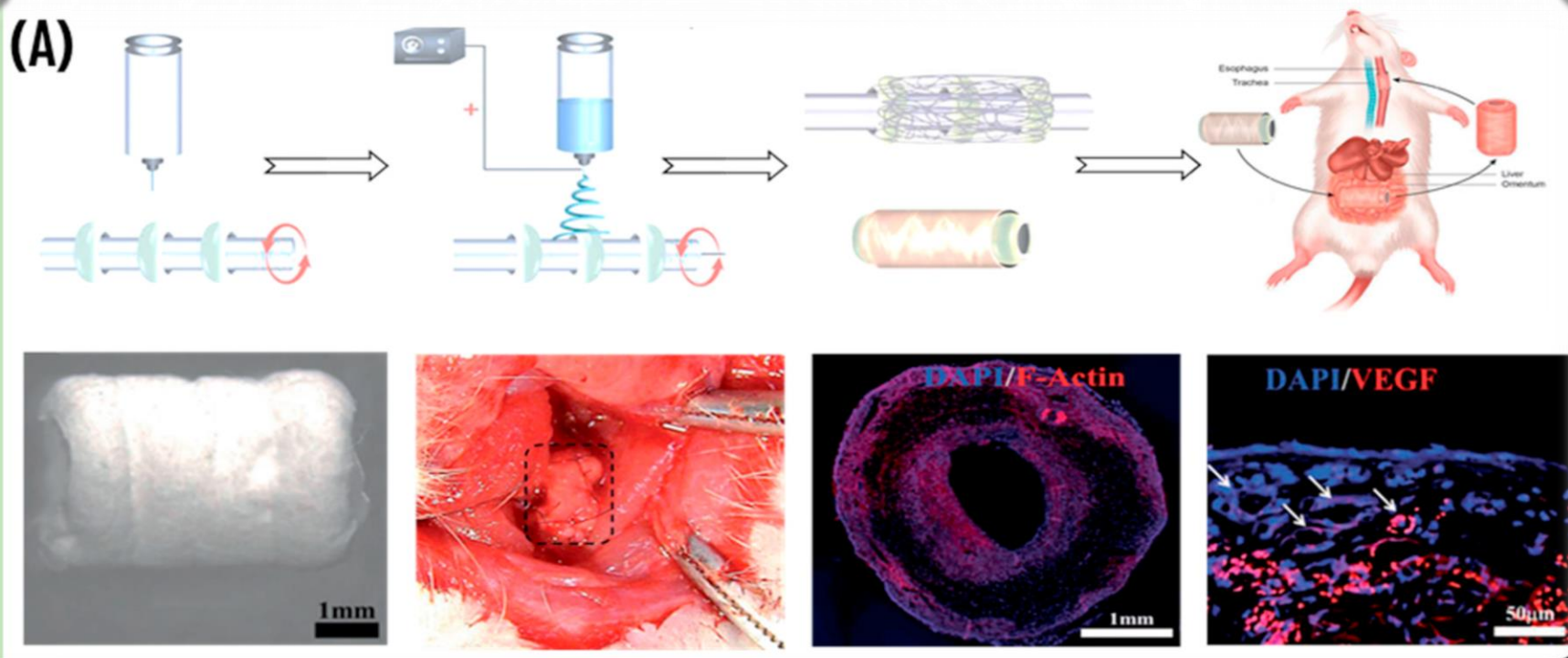


	Bioprinting tool			
	Inkjet	Microextrusion	LAB	SLA/DLP
Print speed	Fast	Slow-Moderate	Moderate -Fast	Fast
Quality and integrity of 'z' dimension	Low	High	Low-Moderate	Moderate-High
Resolution in xy	Moderate (10–100 μm droplets)	Low (100–300 μm filaments)	Moderate (– 10 μm droplets)	High (– 1.2 μm voxels)
Cell density	Low (10 ⁶ cell/ml)	High (cell spheroids 10 ⁹ cells/ml)	Moderate - High (10 ⁹ cells/ml)	Low - Moderate (10 ⁶ cell/ml)
Cell viability	High (80–90%)	Low –Moderate – High (40–90%)	High (– 95%)	Moderate - High (– 85%)
Bioink viscosity	Very low (≤12 mPa/s)	Very high (30–10 ⁷ mPa/s)	Low (1–300 mPa/s)	Moderate (≤2000 mPa/s)
Process principles and key features	Ejection and deposition of liquid droplets through a pulsed-actuated nozzle. The deposited bioink requires further post-processing to stabilize its structure via chemical or photo-crosslinking curing	A continuous filament is extruded from a nozzle under mechanical or pneumatic pressure. Structures often need to be stabilized further by post-processing (chemical or photo-crosslinking curing). Biocompatible thermoplastics are printed hot and solidify at room temperature.	Nozzle-free system, a laser locally creates a gas bubble that ejects bioink droplets from a donor film onto a substrate and the construct requires further post-processing via chemical or photo-crosslinking.	Nozzle-free system, patterned UV light induces layer-by-layer polymerization of a liquid photoactivable bioink, creating a 3D structure, no post-processing is required.
Pros	Multiple bioinks can be used simultaneously (in as many nozzles). The equipment is relatively inexpensive	Compatible with the majority of hydrogel bioinks and other highly viscous inks (e.g. cell spheroids, and thermoplastic polymers) and with a wide range of resulting feature dimensions.	Nozzle free system (no clogging), and no thermal or shear stress involved.	Nozzle free system (no clogging), precise multi-layer fabrication. No post-processing needed
Cons	Risk of thermal and mechanical stress to cells, requires a rapidly gelling bioink to post-stabilize the structure, and prone to nozzle clogging	Nozzle clogging, high shear stress may lead to reduced cell survival, and the bioink requires post-processing (curing\ solidification) to maintain its shape. Multiple bioinks can only be deposited sequentially.	Expensive hardware, metallic particle contamination, time-consuming, and fabrication limited to a single bioink.	Cumulative UV exposure may induce cell toxicity, Fabrication limited to a single bioink.

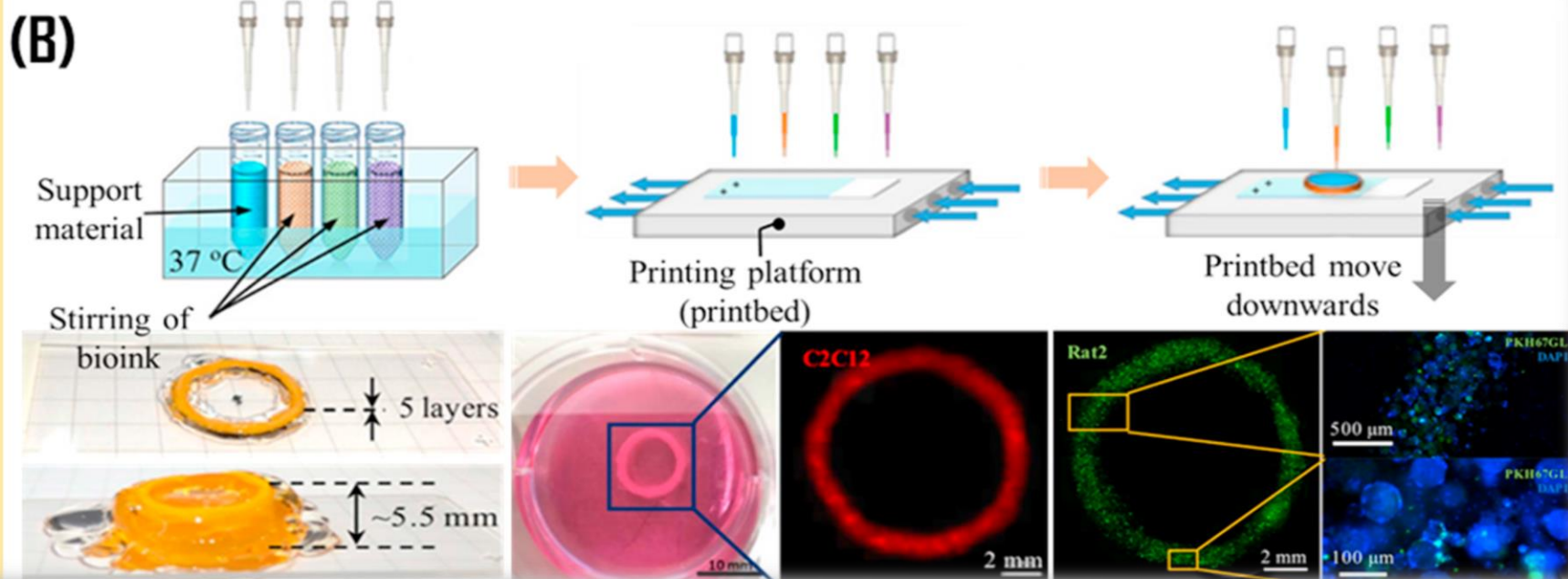
(LAB)

(SLA\ DLP)

Thermoplastic polymer-based construct

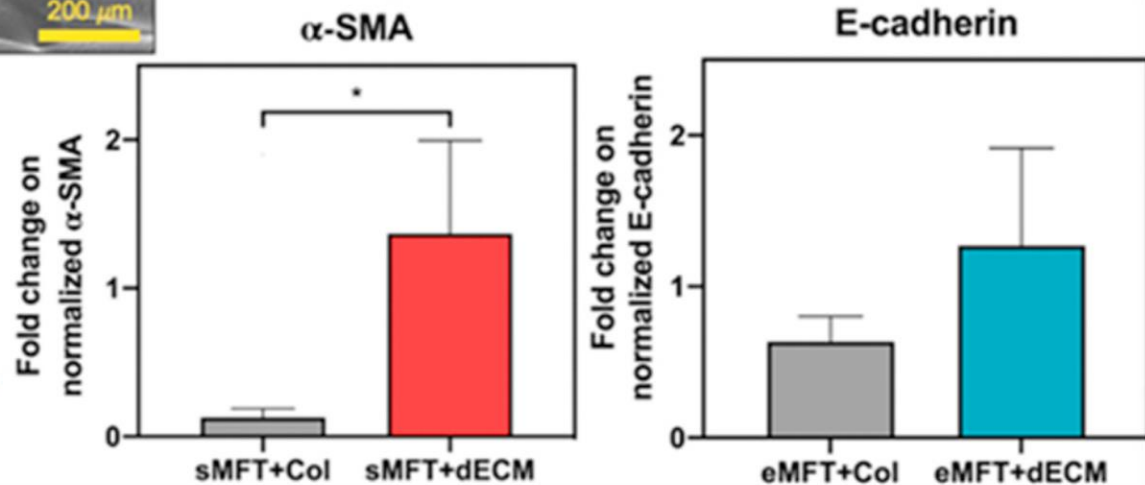
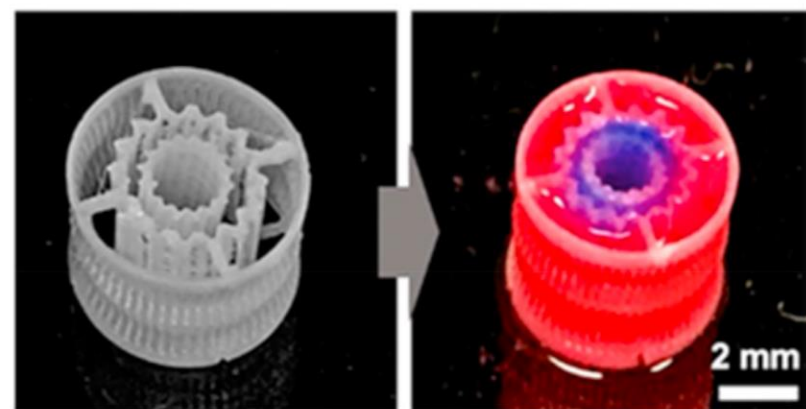
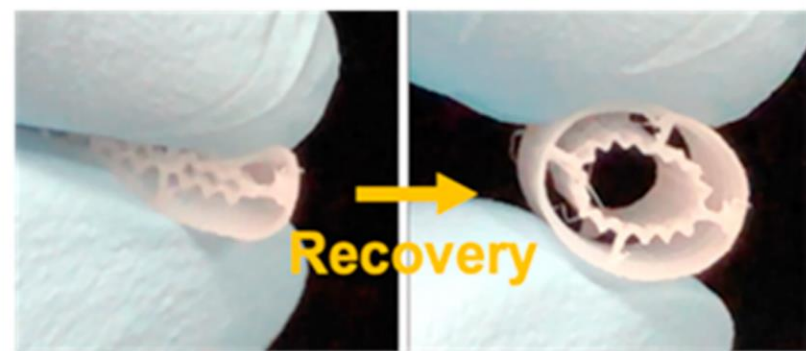
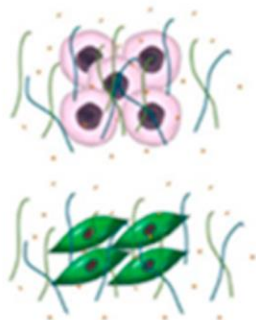
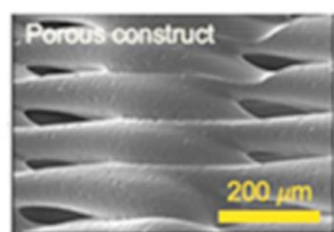
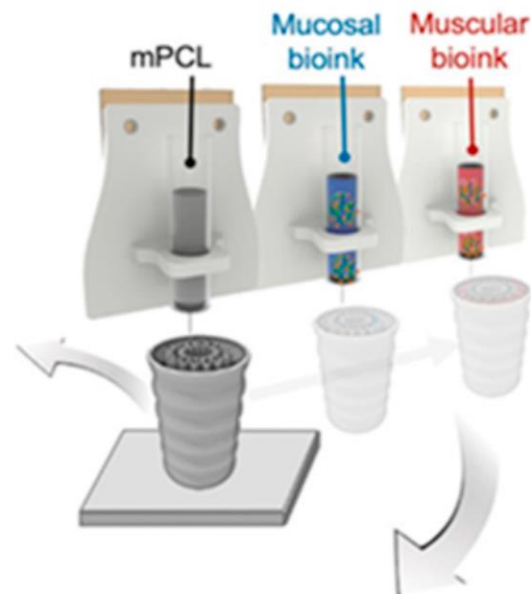
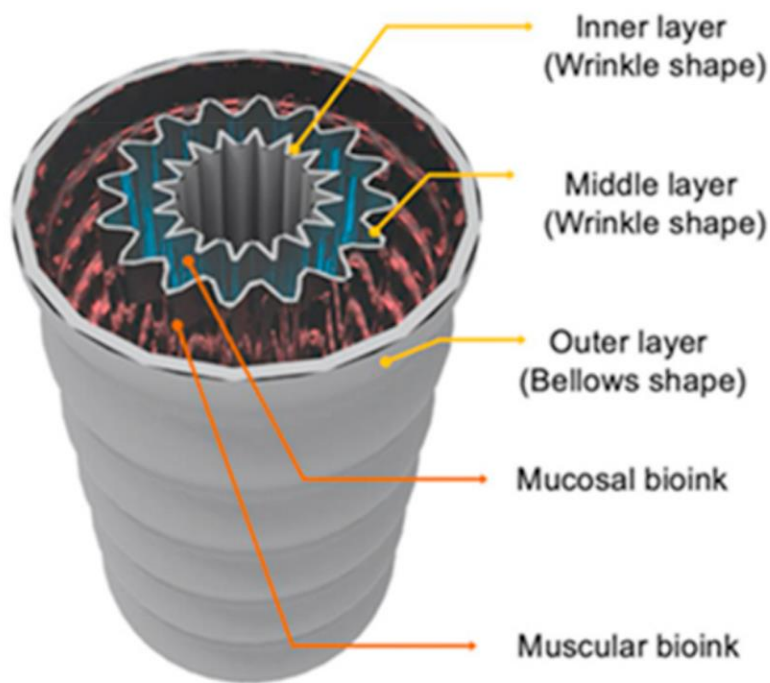
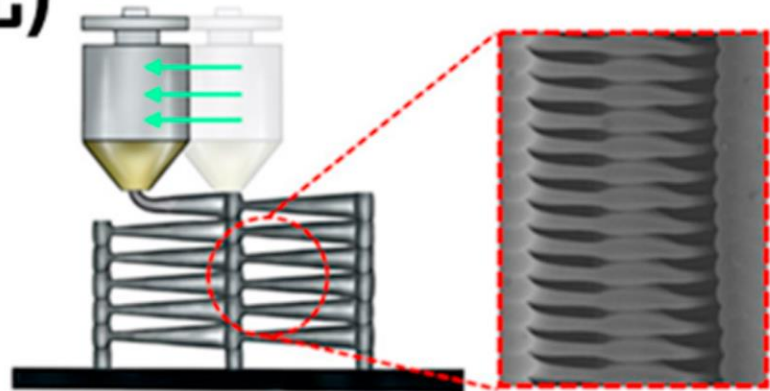


Hybrid hydrogel-based construct

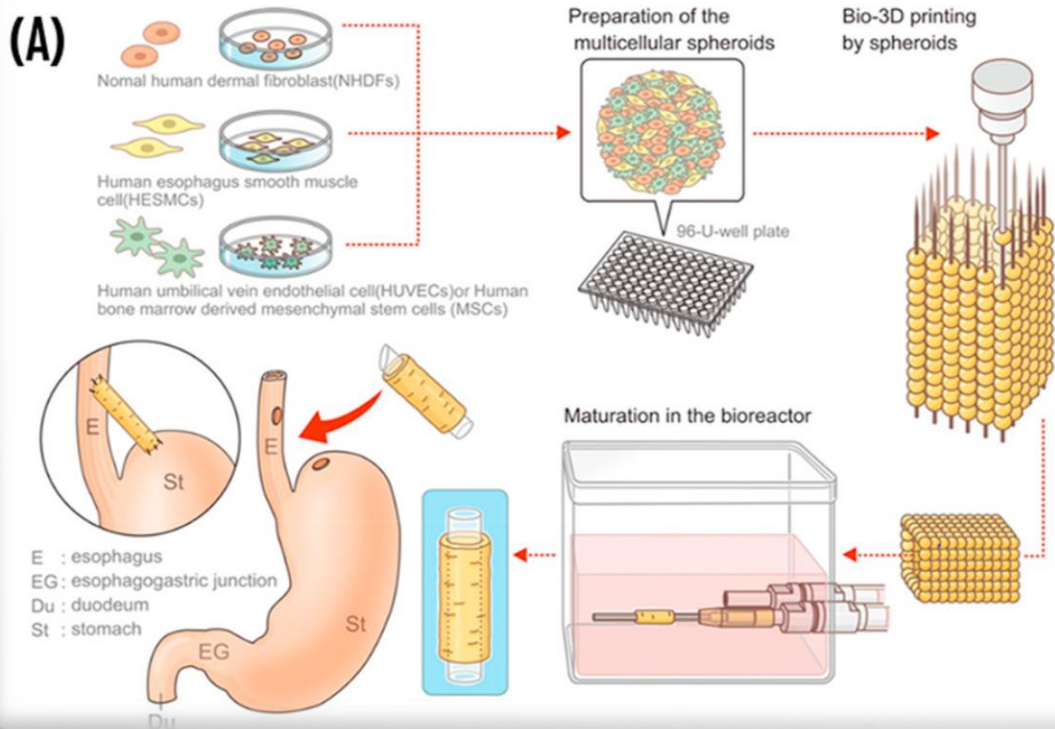


Thermoplastic frame filled with decellularized ink-based construct

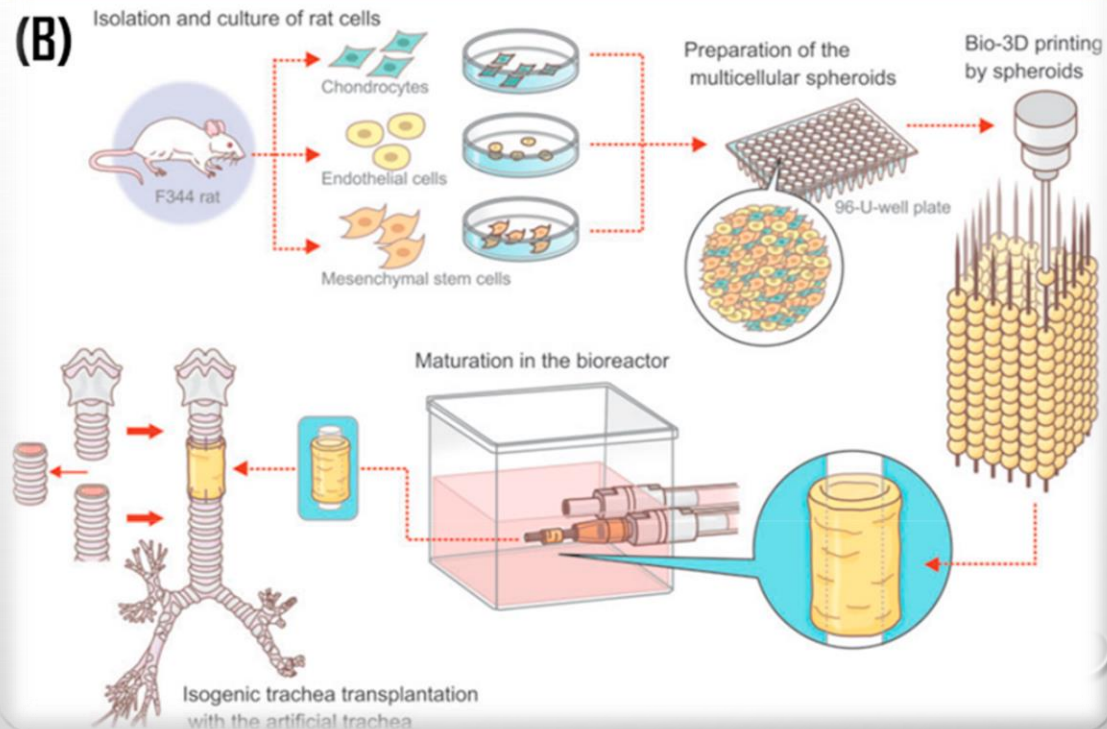
(C) Dragging technique



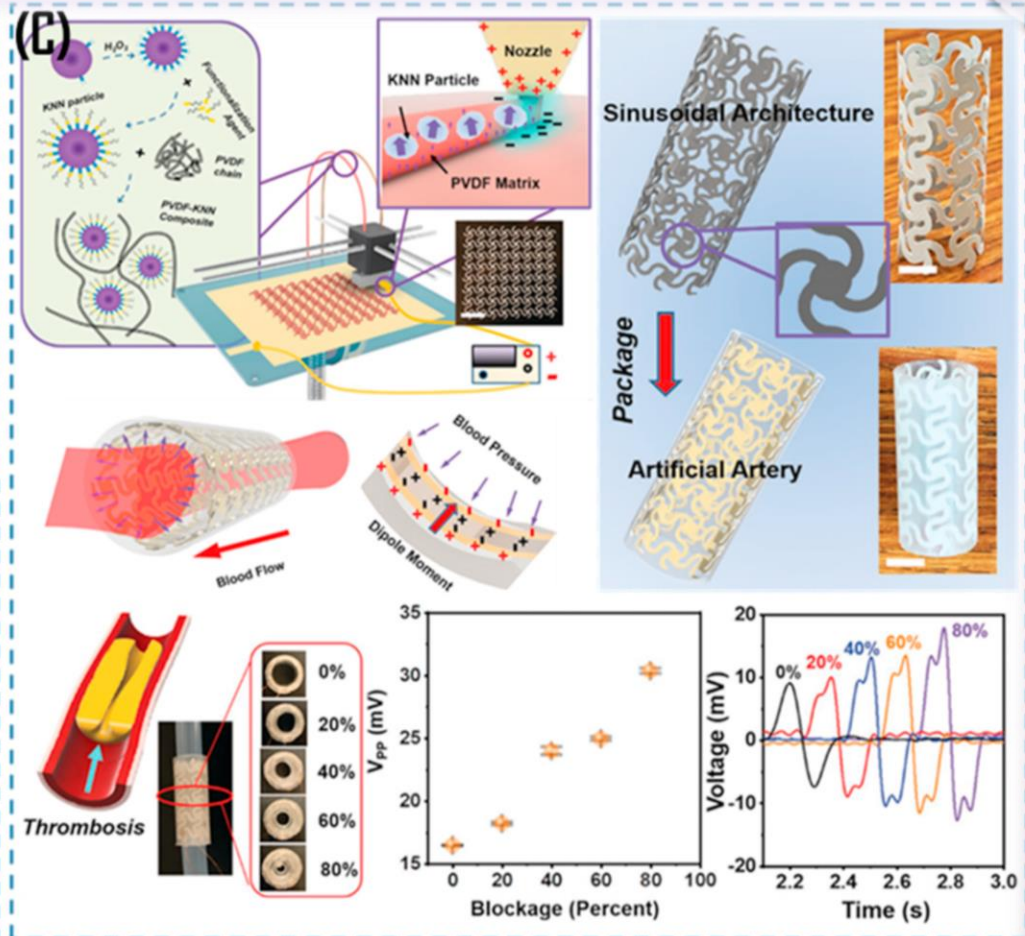
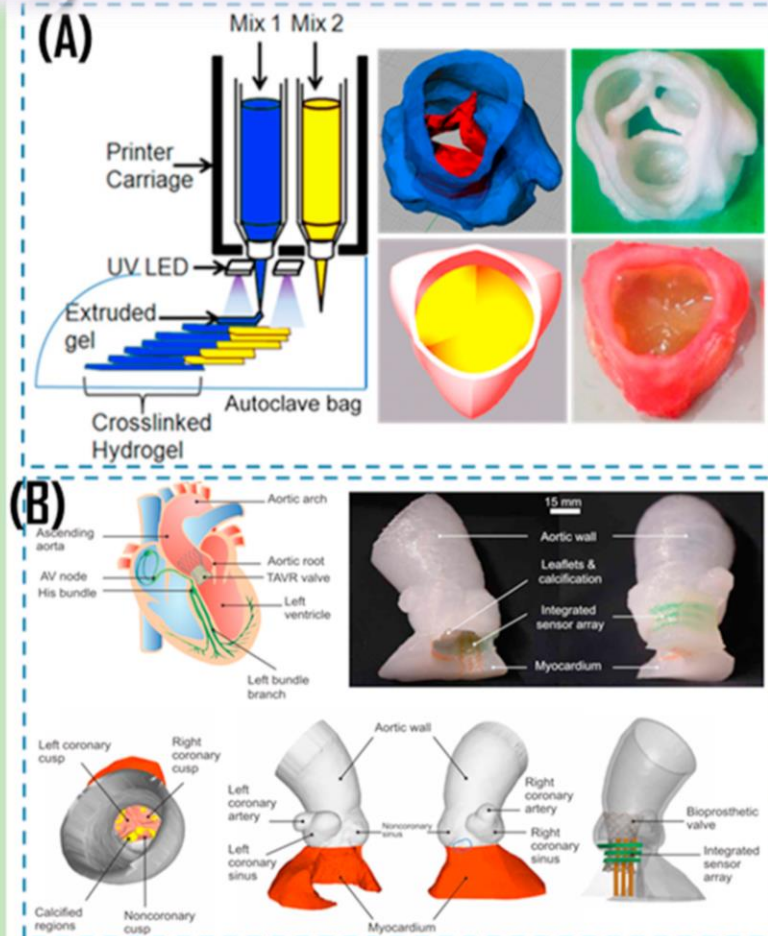
Scaffold-free esophageal substitute



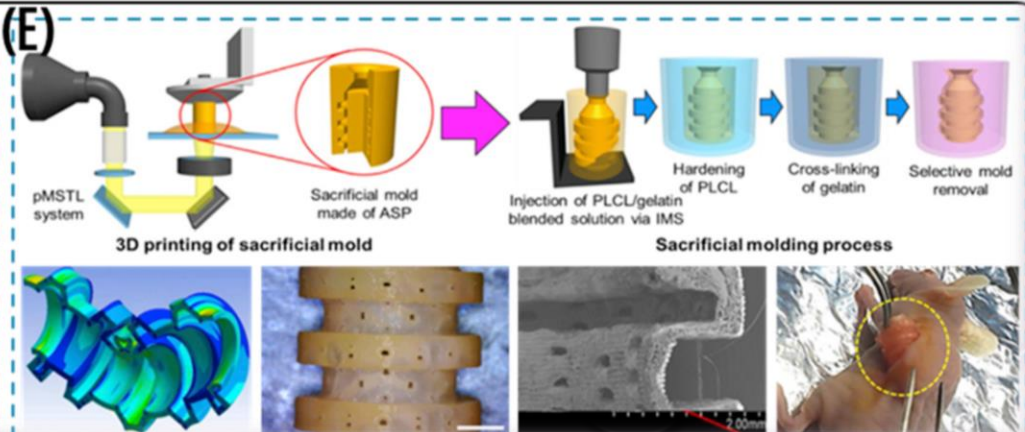
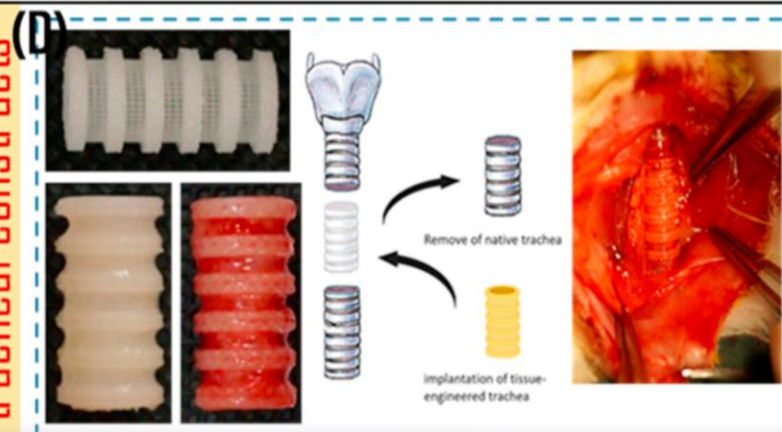
Scaffold-free tracheal substitute



3D bioprinting of vascular constructs



3D bioprinting of tracheal constructs



ĎAKUJEM ZA POZORNOST!

