

## **MEZENHIMSKE MATIČNE STANICE: IMUNOMODULATORNE ZNAČAJKE I KLINIČKA PRIMJENA**

**MESENCHYMAL STEM CELLS:  
IMMUNOMODULATORY PROPERTIES AND CLINICAL APPLICATION**

MIRNA GOLEMOVIĆ, MARIJANA ŠKIFIĆ, BRANKA GOLUBIĆ ČEPULIĆ\*

**Deskriptori:** Mezenhimske matične stanice – imunologija; Multipotentne matične stanice – imunologija; Imunomodulacija; Transplantacija mezenhimskih matičnih stanica

**Sažetak.** Mezenhimske matične stanice (MMS) multipotentne su nekrvotvorne stanice prvobitno otkrivene u koštanoj srži. MMS su imunoprivilegirane stanice koje u *in vitro* sustavu izražavaju imunomodulatorne značajke, što ih čini vrlo pogodnima za kliničku primjenu. *Ex vivo* umnožene MMS novi su oblik stanične terapije koji ima vrlo širok raspon potencijalne kliničke primjene. Do sada se u kliničkim studijama potvrdila sigurnost primjene MMS i njihova učinkovitost u tri kliničke situacije: u suzbijanju reakcije presatka protiv primatelja, poticanju prihvata transplantiranih alogeničnih krvotvornih matičnih stanica i poticanju rasta bolesnika s *osteogenesis imperfecta*. Iako mehanizmi imunomodulatornog djelovanja MMS nisu potpuno razjašnjeni, potencijalna korist terapije s MMS opravdava njezinu kliničku primjenu u nekoliko bolesti. U ovom članku dan je povijesni pregled razvoja kliničke primjene MMS i trenutačna znanstvena i klinička dostignuća u tom području. Bolje poznavanje bioloških značajki i mehanizama djelovanja MMS nesumnjivo će omogućiti njihovu širu kliničku primjenu.

**Descriptors:** Mesenchymal stem cells – immunology; Multipotent stem cells – immunology; Immunomodulation; Mesenchymal stem cell transplantation

**Summary.** Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent nonhematopoietic cells that were first identified in bone marrow. Clinical interest for MSCs was initiated by the observation that MSCs are immunoprivileged cells that display immunomodulatory properties *in vitro*. *Ex vivo* expanded MSCs have therefore become a new type of cellular therapy in development with a wide range of potential clinical applications. So far many clinical studies confirmed safety of their use and showed that infused MSCs suppress graft versus host disease, support engraftment of transplanted allogeneic hematopoietic stem cells and stimulate growth in patients with *osteogenesis imperfecta*. Although underlying immunomodulatory mechanisms of action are not completely understood, potential benefit of MSC therapy justifies its clinical use in a broad range of disorders. In this report we give historical overview of MSC discovery and current scientific and clinical achievements in this field. Better insight into their biological properties and mechanisms of action are needed.

Liječ Vjesn 2012;134:42–49

U svim postnatalnim tkivima postoje malene subpopulacije mirujućih (engl. *quiescent*) matičnih stanica koje su, nakon stimulacije lokalnim podražajem, sposobne dati odgovarajuće diferencirano stanično potomstvo i istodobno održavati pričuvu matičnih stanica za buduće potrebe (samoobnavljanje). U koštanoj srži (KS) nalaze se dvije vrste postnatalnih matičnih stanica: krvotvorne i mezenhimske. Obje su vrste matičnih stanica multipotentne stanice koje daju specijalizirano stanično potomstvo. Krvotvorne matične stanice (KMS) odgovorne su za proizvodnju i održavanje svih zrelih krvnih staničnih loza. Mezenhimske matične stanice (MMS) proizvode različite prekursorske stanice koje sudjeluju u međustaničnim interakcijama te luče čimbenike rasta i proteinske matriksa koji sudjeluju u regulaciji hematopoeze i čine stromu KS.<sup>1</sup> Glavne su značajke matičnih stanica sposobnost održavanja ravnoteže između samoobnavljanja i diferencijacije, sposobnost stvaranja velikog broja stanica specijaliziranih za određenu funkciju te plastičnost koja podrazumijeva mogućnost diferencijacije ne samo u tkivo u kojem se nalaze već i u druga tkiva.

Interes za istraživanja MMS započeo je nakon objave zapažanja A. Friedensteina da KS sadržava stanice koje

pričaju na plastičnu podlogu, vretenasta su oblika i sposobne su diferencirati se u stanice koštanog fenotipa.<sup>2</sup> Te su stanice u daljnjim ispitivanjima *in vitro* definirane kao stanice koje stvaraju kolonije što slično malim nakupinama koštanih stanica ili stanicama hrskavice.<sup>2,3</sup> Tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća mnoge su se istraživačke skupine bavile ispitivanjem značajki tih stanica i potvrdile da su one multipotentne i da se u kulturi *in vitro* mogu diferencirati ne samo u osteoblaste već i u hondrocite i adipocite.<sup>4,5</sup> Budući da su MMS izolirane iz KS imale sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u najmanje tri različita tkivna odjeljka, zadovoljile su kriterije da dobiju naziv »multipotentne matične stanice«. Caplan je 1991. godine počeo rabiti naziv »mezenhimske matične stanice« koji je potom postao opće prihvaćen.<sup>6</sup> Ranih 90-ih godina prošlog stoljeća istraživanja

\* Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb (dr. sc. Mirna Golemović, dipl. ing. mol. biol.; Marijana Škifić, dipl. ing. mol. biol.; prim. mr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. M. Golemović, Zavod za transfuzijsku medicinu i staničnu terapiju, KBC Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: mgolemov@kbc-zagreb.hr

Primljeno 27. prosinca 2010., prihvaćeno 15. srpnja 2011.

MMS doživljavaju pravi procvat, pogotovo u području njihove potencijalne primjene u staničnoj terapiji. Danas je poznato da je MMS moguće izolirati iz mnogih tkivnih odjeljaka poput koštane srži, krvi iz pupkovine, kosti, masnog tkiva, periferne krvi, mišića, hrskavice, jetre, kože, slezene, timusa, fetalne jetre, tkiva pupkovine, posteljice i amnionske tekućine.<sup>7-10</sup>

### Značajke MMS *in vitro*

Većina metoda izolacije MMS temelji se na već spomenutom svojstvu tih stanica da prijanjaju za plastičnu podlogu.<sup>11</sup> No, svojstvo adhezije za plastičnu podlogu posjeduju i druge populacije stanica poput makrofaga, endotelnih stanica, limfocita i glatkih mišićnih stanica. Stoga je početna kultura MMS podrijetlom iz bilo kojega tkivnog izvora vrlo heterogenoga staničnog sastava. Međutim »kontaminirajuće« stanice postupno se gube iz kulture *in vitro* zbog ponavljanih ciklusa presađivanja te se s vremenom dobiva homogena populacija stanica koje pokazuju značajke MMS. Nakon uspostavljanja kulture *in vitro* stanice prolaze početni stadij prilagodbe na uvjete okoline, nakon čega se počinju ubrzano dijeliti. Pritom vrijeme potrebno za udvostručenje stanične populacije (engl. *population doubling time, PDT*) ovisi o davatelju i početnoj gustoći nasađenih stanica. Brzina umnažanja MMS *in vitro* dodatno se može ispitati testom koji se temelji na svojstvu uzgojenih MMS da stvaraju kolonije prilikom nasađivanja stanica u maloj gustoći (engl. *colony forming unit-fibroblast, CFU-F*).<sup>12</sup> Ovaj je test dobar pokazatelj proliferacijske sposobnosti MMS.

### Imunofenotip

MMS izražavaju brojne površinske molekule, no unatoč tomu nije moguće definirati imunofenotip koji bi bio specifičan samo za MMS. Općenito je prihvaćeno da ljudske MMS ne izražavaju biljege krvotvornih stanica CD45, CD34, CD14 i CD11, kostimulatorne molekule CD80, CD86, CD40 i adhezijske molekule CD31 (PECAM-1), CD18 (LCAM), CD56 (NCAM-1). S druge strane, MMS izražavaju biljege CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 i Stro-1 i adhezijske molekule CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1 i CD29.<sup>13</sup> Važno je naglasiti da izražaj površinskih biljega MMS uzgajanih *in vitro* ne mora uvijek odgovarati obrascu izražaja *in vivo*.<sup>14</sup> Naime, na izražaj površinskih biljega mogu utjecati brojni čimbenici poput tkivnog izvora, metode izolacije stanica, uvjeta kulture stanica *in vitro* i sl. Ova je varijabilnost osobito prisutna tijekom ranijih ciklusa presađivanja kada kultura MMS još nije homogena i kada su MMS još pod utjecajem čimbenika koje luče druge stanice. Također, na brojnim je primjerima pokazano da je vrsta tkiva iz kojeg se izoliraju MMS jedan od glavnih čimbenika koji može utjecati na njihov fenotip. Usporedbom MMS izoliranih iz koštane srži s onima koje su izolirane iz masnog tkiva (tzv. procesirani lipoaspirat, PLA) uočena je razlika u izražaju određenih biljega. Tako je biljeg CD49d izražen na stanicama PLA, ali ne i na MMS iz koštane srži. S druge strane, stanice iz PLA ne izražavaju biljeg CD106 koji je izražen na MMS iz koštane srži i koji je funkcionalno povezan s hematopoezom.<sup>15,16</sup>

### Multipotentnost

Kako bi se dokazalo da su MMS uzgojene u kulturi *in vitro* uistinu multipotentne matične stanice, potrebno je funkcijskim testovima potvrditi da se one tijekom uzgoja u specifičnim uvjetima *in vitro* mogu diferencirati u različite vrste stanica, i to najčešće u osteoblaste, adipocite i hondro-

cite. Iako je uzgajanim MMS najvjerojatniji diferencijacijski put osteogeneza,<sup>17</sup> uzgoj MMS u prisutnosti askorbinske kiseline, β-glicerolfosfata i deksametazona tijekom 2–3 tjedna potiče pravu osteogenezu. U takvim uvjetima povećava se izražaj alkalne fosfataze u stanicama, pa dolazi do nakupljanja kalcija i proteoglikana. Mineralni depoziti dokazuju se bojom *Alizarin red* ili Von Kossom tehnikom.<sup>18</sup>

Uzgoj MMS u prisutnosti deksametazona, inzulina, izobutil metil ksantina (IBMX) i indometacina tijekom 2–3 tjedna potiče adipogenezu. U stanicama se pojavljuju vakuole ispunjene kapljicama masti (lipidi), koje se napslijetku ujedine i ispune čitavu unutrašnjost stanica. Dolazi i do promjena na genskoj razini, pa stanice izražavaju transkripcijski čimbenik PPARγ2 i stvaraju protein aP2 koji se veže za masne kiseline.<sup>18</sup> Nakupine masti u stanicama mogu se dokazati histološki bojenjem s Oil Red O.

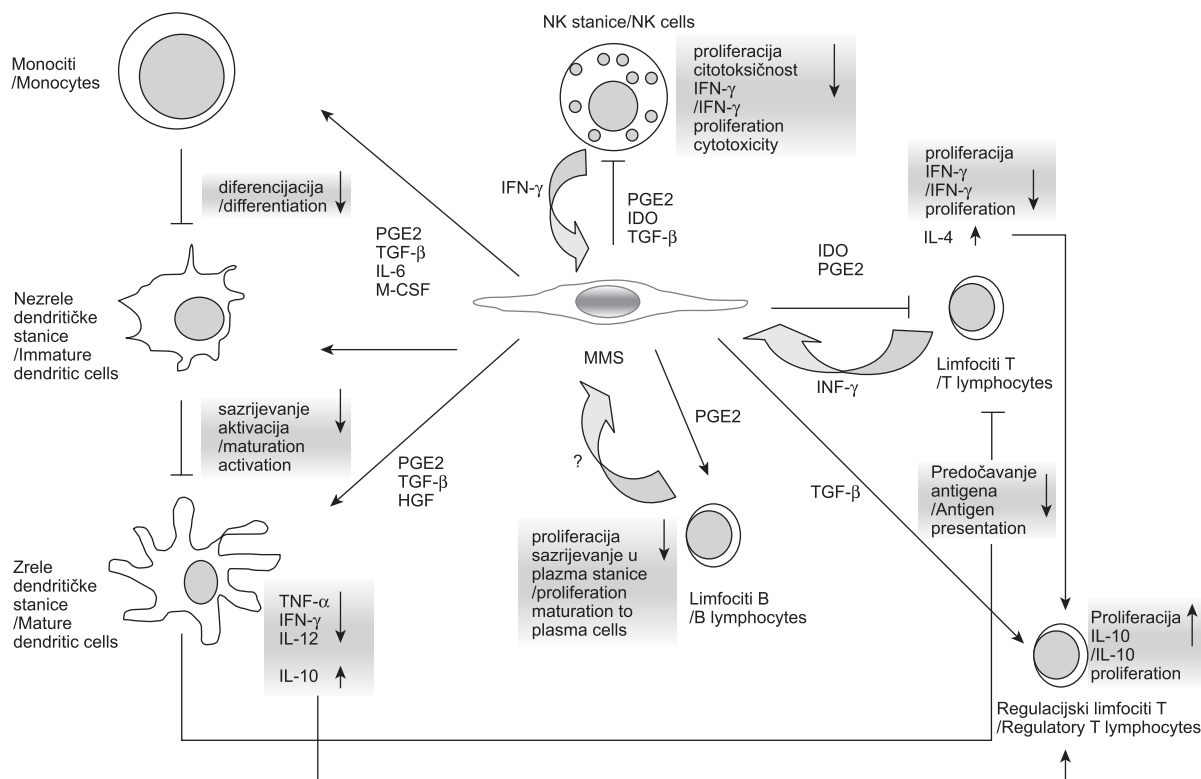
Za poticanje hondrogeneze MMS je potrebno uzgajati u prisutnosti transformirajućeg čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor β, TGF-β*).<sup>19</sup> U takvim se uvjetima oblikuje višeslojni stanični talog. Stanice stvaraju kolagen tipa II koji je tipičan za zglobnu hrskavicu, a u izvanstaničnome matriksu nakupljaju se proteini s vezanim glikozaminoglikanima koji se snažno boje toluidinskim modrilom.<sup>18</sup> Iako je prema preporukama Međunarodnog društva za staničnu terapiju (engl. *International Society for Cellular Therapy, ISCT*) za definiranje MMS *in vitro* dovoljno dokazati njihovu trolinijsku diferencijacijsku sposobnost, pokazano je da se u uvjetima *in vitro* MMS mogu potaknuti na diferencijaciju i u druge stanice poput miocita, tenocita, hepatocita, neurona i stanica visceralnog mezoderma (endotelne stanice). Tako uzgoj MMS u prisutnosti 5-azacitidina i amfotericina B rezultira diferencijacijom MMS u mioblaste čijom fuzijom nastaju miotubuli sposobni za ritmičke kontrakcije,<sup>20</sup> a uzgoj u prisutnosti čimbenika rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor, HGF*) i fibroblastnog čimbenika rasta 4 (engl. *fibroblast growth factor 4, FGF-4*) potiče diferencijaciju u hepatocite.<sup>21</sup> Mareschi i suradnici uspjeli su potaknuti diferencijaciju MMS i u neuralne prekursorne s funkcijom stvaranja akcijskih potencijala, što je značajka pravih neurona.<sup>22</sup>

### Kariotip

Iako prema definiciji matičnih stanica MMS karakterizira sposobnost samoobnavljanja, neizbježno je da tijekom ponavljanih ciklusa umnažanja *in vitro* neke stanice uđu u proces senescencije praćen postupnim gubitkom multipotentnosti. Senescencija je povezana s umjerenim skraćivanjem telomera i zastojem u staničnom ciklusu. Ako stanice izbjegnju ovaj zastoj, nastavljaju se dijeliti dok telomere ne postanu toliko kratke da stanice uđu u fazu krize, karakteriziranu općom nestabilnošću kromosoma koja izaziva masovnu apoptozu. Iako je utvrđeno da ljudske MMS mogu doživjeti spontanu transformaciju u kulturi *in vitro*, takva je pojava vrlo rijetko opisana.<sup>10,23</sup> Navedene kromosomske aberacije nisu se međutim pokazale stabilnima i održivima tijekom ponavljanih ciklusa presađivanja, na temelju čega se zaključilo da opisane promjene nisu patološke prirode te da stanice koje sadržavaju te promjene nemaju selektivnu prednost u kulturi stanica *in vitro*.<sup>24</sup>

### Imunološke značajke

MMS izražavaju takozvani neimunogeni imunofenotip koji odlikuje vrlo slab izražaj HLA I<sup>+</sup> i neizražaj HLA II<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>. To omogućuje njihovu transplantaciju u alogenog domaćina i bez prethodne imunosupresije.<sup>16</sup>



Slika 1. Shematski prikaz imunomodulatornog djelovanja MMS. PGE2, prostaglandin E2; TGF- $\beta$ , transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ ; IL-4, interleukin 4; IL-6, interleukin 6; IL-12, interleukin 12; IL-10, interleukin 10; TNF $\alpha$ , čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ ; M-CSF, čimbenik rasta makrofagnih kolonija; IDO, indolamin 2,3-dioksigenaza; IFN- $\gamma$ , interferon gama; HGF, čimbenik rasta hepatocita.

Figure 1. Schematic presentation of immunomodulatory action of MSC. PGE2, prostaglandin E2; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; IL-4, interleukin 4; IL-6, interleukin 6; IL-12, interleukin 12; IL-10, interleukin 10; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; IDO, indolamine 2,3-dioxygenase; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; HGF, hepatocyte growth factor

Iako MMS mogu predočiti antigen u sklopu HLA-molekula klase I te tako aktivirati aloreaktivne T-stanice, zbog izostanka kostimulatornih molekula limfociti T će ostati anergični.<sup>25</sup> To upućuje na ulogu MMS u mehanizmu stvaranja imunostne tolerancije. U *in vitro* modelima dokazano je da MMS izražavaju immunosupresivna svojstva snizujući odgovor limfocita T u reakciji pomiješanih limfocita (engl. *mixed lymphocyte reaction*, MLR) i proliferaciju limfocita T nakon stimulacije mitogenima.<sup>26</sup> Ovaj oblik immunosupresije neovisan je o HLA-podudarnosti između MMS i limfocita T, a točan mehanizam nije potpuno razjašnjen. Mnoge studije upućuju na to da supresija proliferacije limfocita T nema u pozadini imunostnu restrikciju, već da dolazi do neselektivne inhibicije njihove proliferacije zbog djelovanja topljivih čimbenika za čije je lučenje ključan međustanični kontakt MMS i limfocita T.<sup>10,26</sup> DiNicola i suradnici pretpostavili su da je u takvom djelovanju ključno lučenje TGF- $\beta$  i HGF, jer su dokazali da je nakon blokiranja njihova djelovanja moguće ponovno uspostaviti proliferativni odgovor limfocita T *in vitro*.<sup>27</sup> No, sve je više dokaza u literaturi koji upućuju na to da vrsta mehanizma imunomodulacije posredstvom MMS ovisi o vrsti njegovog poticaja. U nastojanjima da se identificiraju ključni čimbenici, enzim indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO) istaknuo se kao potencijalna molekula koja značajno sudjeluje u mehanizmima imunomodulacije posredstvom MMS. Nakon stimulacije upalnim citokinima, MMS počinju izražavati aktivnost IDO koja je praćena degradacijom triptofana, što uzrokuje inhibiciju proliferacije limfocita.<sup>10,28</sup> Taj nalaz govori u prilog tvrdnji da MMS nespecifično inhibiraju proliferaciju limfocita T *in*

*in vitro* djelujući samo na efektorski dio T-staničnog odgovora. Tu hipotezu podupire i nalaz Ramasamyja i suradnika koji su opisali da MMS mogu inhibirati i proliferaciju malignih stanica.<sup>29</sup>

MMS mogu djelovati imunomodulatorno utjecajem na sazrijevanje dendritičkih stanica. Potičući proizvodnju protuupalnih (IL-10) i smanjujući lučenje upalnih (IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) citokina, MMS stvaraju okruženje u kojem nezrele dendritičke stanice ne mogu sazrijevati na pravi način i stoga ne mogu aktivirati limfocite T.<sup>10</sup>

Iako pravi mehanizam djelovanja MMS još nije potpuno razjašnjen i očito uključuje složenu interakciju međustaničnih kontakata i cijele mreže topljivih čimbenika, i dalje se smatra da su najvažniji imunomodulatorni učinci MMS inhibicija proliferacije limfocita T i inhibicija sazrijevanja dendritičkih stanica.

Navedene imunomodulatorne značajke MMS dokazane su u *in vitro* modelima te ih treba potvrditi i u odgovarajućim studijama *in vivo*. Razumijevanje njihova prihvatanja, udomljavanja i preživljenja nakon transplantacije pomoći će u rasvjetljavanju mehanizma njihova djelovanja *in vivo*. No, očiti dokaz djelotvornosti MMS *in vivo* jest poboljšani ishod alogene transplantacije koštane srži zbog boljeg prihvatanja presatka<sup>30</sup> i sprječavanja pojave reakcije presatka protiv primatelja (engl. *Graft Versus Host Disease*; GvHD).<sup>31</sup>

#### Tkivni izvori MMS

Unatoč zajedničkim općim značajkama, MMS iz raznih tkiva ipak pokazuju male razlike koje se mogu očitovati u

fenotipu, klonogenom i diferencijacijskom potencijalu.<sup>8</sup> Iako je koštana srž tradicionalni izvor MMS, sve popularniji postaju i njihovi alternativni tkivni izvori. Pri tome sve veću pozornost dobivaju tkiva koja ne zahtijevaju invazivne metode prikupljanja stanica kao što je to slučaj pri punkciji koštane srži. U tom bi smislu krv iz pupkovine bila idealan izvor takvih stanica. Međutim nekoliko je čimbenika koji ovaj izvor MMS čine slabo iskoristivim. Prvi je problem što izolacija MMS iz krvi iz pupkovine ide na štetu krvotvornih matičnih stanica u ionako volumenom malom i vrijednom transplantatu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Drugi je problem vrlo malen broj MMS u krvi iz pupkovine. S porastom gestacijske dobi njihov broj sve više pada tako da u krvi iz pupkovine donošenog djeteta iznosi svega 0,3 MMS na 10<sup>6</sup> mononuklearnih stanica (MNS).<sup>32</sup> Stoga se uspješno umnažanje MMS iz krvi iz pupkovine u prosjeku postiže u svega 20–30% slučajeva.<sup>9,32</sup> S druge strane, tkivo pupkovine pokazalo se kao bogat izvor MMS.<sup>9,33</sup> Postupak izolacije MMS iz tkiva pupkovine nešto je složeniji, no uvjeti umnažanja bitno se ne razlikuju od onih koji su već opisani za MMS iz koštane srži. S obzirom na raspoloživost pupkovine, ovaj je izvor potencijalno iskoristiv u svrhu stvaranja zalihe staničnih pripravaka MMS. Poznato je da biološke osobitosti odraslih davatelja koštane srži, poput dobi,<sup>34</sup> mogu značajno utjecati na brzinu rasta MMS *in vitro*. U slučaju uporabe MMS iz tkiva pupkovine utjecaj dobi je zanemariv, unatoč biološkoj raznolikosti između davatelja.

#### Kontrola kvalitete staničnog pripravka prije izdavanja i kliničke primjene

U različitim znanstvenim istraživanjima i kliničkim studijama rabljene su različite metode izolacije stanica iz raznih tkivnih odjeljaka, kao i različiti uvjeti umnažanja i karakteriziranja uzgojenih MMS. To je znatno otežalo usporedbu rezultata dobivenih u tim studijama, a samim time i napredak u ovom području. Tomu je svakako pridonijela i činjenica da dugo nisu postojali standardni kriteriji za definiranje MMS. Zbog toga je Vijeće za mezenhimske i tkivne matične stanice ISCT-a (engl. *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) predložilo minimalne kriterije za karakterizaciju umnoženih ljudskih MMS.<sup>35</sup> Predloženi minimalni kriteriji za definiranje MMS jesu: 1) prijanjanje stanica na plastičnu podlogu, 2) specifičan imunofenotip i 3) multipotentni diferencijacijski potencijal.

Dakle, od MMS se očekuje da u standardnim uvjetima uzgoja *in vitro* adheriraju na plastičnu podlogu i da se točnom citometrijom potvrdi da  $\geq 95\%$  uzgojenih stanica izražava biljege CD105, CD73 i CD90 i da ne izražavaju ( $\leq 2\%$ ) biljege CD45, CD34, CD14, CD19 i HLA II. Samo iznimno, i to prilikom stimulacije interferonom gama (IFN- $\gamma$ ), MMS izražavaju molekule HLA-DR, no i dalje moraju zadovoljavati navedene kriterije.<sup>35</sup>

Treći kriterij za definiranje MMS je dokaz da su stanice multipotentne, tj. da se u specifičnim uvjetima rasta mogu diferencirati u osteoblaste, adipocite i hondrocite.<sup>35</sup>

Ako se MMS umnažaju tijekom velikog broja ciklusa presađivanja, svakako je preporučljivo provjeriti i kariotip. Tijekom većeg broja presađivanja moguć je razvoj kromosomskih promjena koje bi mogle pridonijeti razvoju nove stanične linije koja ne bi zadovoljila zahtjeve za MMS. No, ova se pretraga zbog kliničke primjene stanica uzgojenih u vrlo malom broju ciklusa presađivanja ne smatra nužnom za rutinsko definiranje MMS.

Prilikom izdavanja staničnog pripravka MMS treba zadovoljiti sve gore navedene zahtjeve. Za kontrolu kvalitete

svakako je potrebno učiniti i mikrobiološko testiranje pripravka, uključujući i testiranje na mikoplazmu.<sup>8</sup>

#### Klinička primjena MMS umnoženih *in vitro*

Budući da je učestalost MMS u aspiratima koštane srži vrlo niska i iznosi svega 2–5 MMS/10<sup>6</sup>MNS,<sup>34,36</sup> umnažanje MMS *in vitro* i provjera njihovih bioloških osobitosti nužni su za znanstvena i klinička ispitivanja, kao i za njihovu kliničku primjenu.<sup>37</sup> Glavni problemi pri umnažanju alogeničkih MMS za kliničku primjenu jesu malen početni volumen aspirata koštane srži, uvjeti uzgoja stanica *in vitro*, razdoblje nužno za umnažanje MMS te postizanje zadovoljavajućeg broja MMS za infuziju, što ovisi i o biološkim značajkama samih dobrovoljnih davatelja. Katkada je potrebno u vrlo kratkom vremenu umnožiti odgovarajući broj MMS *in vitro* da bi se postigao odgovarajući terapijski učinak u primatelja. No, s obzirom na sve navedene čimbenike to je često teško izvedivo. S obzirom na to da su MMS imunomodulatorne i imunoprivilegirane stanice koje ne zahtijevaju HLA-podudarnost između davatelja i primatelja, otvara se mogućnost njihove primjene u kotransplantaciji uporabom stanica od bilo kojega zdravog dobrovoljnog davatelja. Na taj je način moguće uvesti tzv. »off-the-shelf« model i imati na zalih pripravke MMS koji bi za potrebe kotransplantacije bili na raspolaganju u svakom trenutku.<sup>38,39</sup>

U pokusnim *in vivo* modelima pokazalo se da je nakon transplantacije iz koštane srži primatelja teško ponovno prikupiti transplantirane MMS pa se stoga pretpostavilo da one nakon transplantacije migriraju u razna tkiva i organe gdje posreduju u lokalnoj imunosupresiji. Na mišjim se modelima sukladno tomu dokazalo da na infundirane MMS migriraju u limfoidne organe<sup>40</sup> i na mjesta ozljede tkiva ili rasta tumora.<sup>41</sup>

Kod intravenske (iv.) primjene MMS pokazuju sklonost nakupljanja u kapilarnim mrežama mnogih tkiva, posebno pluća,<sup>42</sup> a to je velik problem u sustavnoj uspostavi zadovoljavajućeg broja stanica. U pokusnim *in vivo* modelima ovaj problem pokušava se izbjeći prethodnom primjenom vazodilatatora<sup>42</sup> i intraarterijskom infuzijom.<sup>42,43</sup> U slučajevima teških oštećenja tkiva, kao npr. oštećenjima uzrokovanim radioaktivnim zračenjem, MMS se primjenjuju lokalno na željeno mjesto djelovanja.<sup>44</sup> Izbor načina primjene staničnog pripravka stoga ovisi o namjeni primjene MMS u primatelja te može značajno utjecati na uspješnost ispostave MMS na željeno mjesto djelovanja.

Autologne MMS prvi su put primijenjene u ljudi 1995. godine,<sup>45</sup> čime je prvi put dokazana sigurnost njihove kliničke primjene. Alogeni pripravak MMS prvi je put primijenjen 2002. godine u bolesnika kojima je već prethodno bila transplantirana alogena koštana srž.<sup>46</sup>

Uzmemo li u obzir njihova jedinstvena imunomodulatorna svojstva, MMS su obećavajući oblik stanične terapije ponajviše u slučajevima imunosnih i hematoloških bolesti te pri transplantaciji solidnih organa. Danas se terapija u obliku infuzije MMS najčešće rabi u liječenju posttransplantacijske reakcije presatka protiv primatelja (GvHD) i liječenju *osteogenesis imperfecta* (OI).

#### Reakcija presatka protiv primatelja

Alogena transplantacija krvotvornih matičnih stanica (KMS) standardni je način liječenja brojnih hematoloških i nehematoloških bolesti. No, oporavak bolesnika nakon

transplantacije ovisi o više čimbenika i potpun hematološki oporavak nije uvijek moguć. Uspješnost alogene transplantacije KMS u znatnoj mjeri ovisi o reakciji presatka protiv leukemije (engl. *Graft versus Leukemia*, GvL) koja je posredovana davateljevim limfocitima T i NK-stanicama. Na žalost, GvL-reakcija često je povezana i s pojavom GvHD. Učinkovito kontroliranje reakcija GvL i GvHD ostaje i danas najveći izazov u području alogene transplantacije. Stoga se u kliničkoj praksi rješenja nastoje naći boljom HLA-podudarnošću davatelja i primatelja, uklanjanjem efektor-skih alogenih limfocita T iz presatka ili naknadnim infuzijama davateljevih limfocita (engl. *donor lymphocyte infusion*, DLI) radi boljeg GvL-odgovora.<sup>28</sup> Zbog intenzivne citotoksične radioterapije i/ili kemoterapije, u bolesnika koji se pripremaju za transplantaciju KMS dolazi i do narušavanja stromalnog mikrookruženja u koštanoj srži. Takvo je oštećenje dugotrajno, a s obzirom na ulogu stromalnog mikrookruženja u prihvatu transplantiranih KMS, svakako može dodatno usporiti oporavak bolesnika nakon transplantacije.<sup>47</sup>

Unatoč činjenici da je koštana srž dobar izvor MMS, standardnom alogenom transplantacijom stanica koštane srži ne postiže se prijenos davateljevih MMS i proizvodnja prekursorskih mezenhimskih stanica u primatelja. Razlog tomu može biti neučinkovito kondicioniranje koje nije u potpunosti uništilo stromu primatelja i/ili neprihvatanje stromalnih progenitora te vrlo malen broj MMS u KS.<sup>34,36,48</sup> Nekoliko kliničkih studija<sup>38,39</sup> ispitalo je učinak kotransplantacije MMS u bolesnika koji su nakon alogene transplantacije KMS oboljeli od akutnog oblika GvHD (aGvHD) refraktornog na terapiju glukokortikoidima. Jednogodišnje preživljenje ovih bolesnika je 30%,<sup>39</sup> a dvogodišnje samo 10%.<sup>38</sup> Klinička studija LeBlanca i sur.<sup>38</sup> provedena je na 55 bolesnika s aGvHD u razdoblju od 2001. do 2007. godine. Bolesnicima su iv. infundirane MMS prethodno umnožene *in vitro* podrijetlom od HLA-podudarnih, poluidentičnih i nepodudarnih dobrovoljnih davatelja.<sup>38</sup> Praćenje oporavka bolesnika uključenih u ovu studiju pokazalo je da se dvogodišnje preživljenje bolesnika s aGvHD uz primjenu MMS podiglo na 52%, što je svakako značajan napredak. Neki su bolesnici odgovorili na samo jednu iv. infuziju pripravka MMS, dok su druga bila potrebne dvije ili više infuzija MMS. Uočeni su različiti odgovori bolesnika kojima su infundirane stanice istog davatelja. Kao što je prethodno utvrđeno u kliničkim ispitivanjima primjene umnoženih MMS u liječenju bolesnika s *osteogenesis imperfecta*,<sup>49,46</sup> ni u ovoj studiji nisu zabilježene akutne, a ni dugoročne neželjene reakcije nakon infuzije alogenih MMS. Isto tako nije uočena korelacija između prethodne terapije bolesnika i njihova odgovora na infuzije MMS. Ovom studijom utvrđena je sigurnost i učinkovitost primjene MMS u slučaju refraktornog aGvHD. Optimalna doza stanica i učestalost infuzija još nisu utvrđene. Medijan broja infundiranih MMS po infuziji bio je  $1,4 \times 10^6$ /kg. Terapijski je cilj postići  $2 \times 10^6$  MMS/kg,<sup>37</sup> no vrlo često taj broj stanica nije moguće postići zbog već navedenih tehničkih i organizacijskih problema koji se javljaju pri njihovom umnažanju.

Primjena MMS djeluje na GvHD, ali ne i na reakciju GvL. To je dobrodošao klinički doprinos, ali ne objašnjava mehanizam djelovanja MMS. Pretpostavlja se da mehanizam djelovanja MMS uključuje i međustanične kontakte i otpuštanje topljivih čimbenika. Smatra se da je jedan od bitnih čimbenika upleten u imunosupresiju izražaj enzima indolamin 2,3-dioksidaze (IDO), koji katalizira konverziju triptofana u kinurenin.<sup>28</sup> U MMS izražaj enzima IDO

potiče se upalnim citokinima koji se otpuštaju tijekom alogenog T-staničnog odgovora. Zbog uklanjanja triptofana iz mikrookruženja inhibira se proliferacija limfocita T.<sup>28</sup> Navedeni mehanizam jedno je od objašnjenja učinkovitog djelovanja MMS u slučaju GvHD, ali ne objašnjava činjenicu da MMS ne ometaju GvL-reakciju. Stoga je nužna dodatna procjena doprinosa i potencijalnih rizika primjene MMS u alogenoj transplantaciji.

### *Osteogenesis imperfecta*

*Osteogenesis imperfecta* (OI) genski je poremećaj mezenhimskih stanica karakteriziran općom osteopenijom, značajno usporenim rastom i pojavom deformiteta kostiju koje postaju izrazito krhke i sklone prijelomima. Bolest prate i abnormalnosti u vezivnom tkivu poput *dentinogenesis imperfecta* i plave obojenosti bjeloočnica. Prema težini kliničke slike razlikuju se četiri tipa OI (tip I-IV). Uzrok bolesti je mutacija u jednom od dva gena za kolagen tipa I, glavni strukturni protein kostiju, koji je ili nefunkcionalan (OI tip II, III i IV) ili ga ima premalo (OI tip I).<sup>50,51</sup>

Trenutačno je glavni način liječenja OI primjena antiresorptivnih lijekova, osobito bisfosfonata, koji povećavaju gustoću kostiju inhibirajući osteoklastno djelovanje.<sup>50</sup> Međutim unatoč tomu što poboljšavaju strukturne parametre kostiju, bisfosfonati ipak ne rješavaju osnovnu patofiziologiju bolesti niti utječu na rast. Nadalje, produljeno vrijeme poluzivota bisfosfonata u kostima (čak do 8 godina) nosi mogućnost neželjenih dugoročnih posljedica za bolesnika. Stanična terapija koja bi osigurala normalne osteoblaste i stvaranje normalnog kolagena omogućila bi rješavanje problema konvencionalne terapije.

Temelj za početak kliničkih studija primjene MMS u djece oboljele od OI bili su prethodni rezultati Pereire i suradnika dobiveni na mišjem modelu OI.<sup>52</sup> Miševi su bili letalno i subletalno ozračeni te potom transplantirani s MMS uzgojenim od miševa divljeg tipa. Dva i pol mjeseca nakon transplantacije kod primatelja je utvrđeno 4–19%-tno prihvaćanje transplantata u različitim tkivima (koštana srž, kost, hrskavica i pluća). Rezultati ovog istraživanja pridonijeli su razvoju ideje da u KS postoje stanice koje imaju sposobnost diferenciranja u nekrvotorna tkiva, uključujući i kost.

Uslijedila je prva klinička studija primjene MMS u djece oboljele od teškog oblika OI tipa III (Horwitz i suradnici, 1999.) koja je bila usmjerena na primjenu transplantacije koštane srži kod nehematološke bolesti i na učinak njezine nekrvotorne komponente u nekrvotornom tkivu.<sup>53</sup> Studija je pokazala da transplantacija stanica nemanipulirane alogene koštane srži rezultira prihvaćanjem stanica davatelja u kosti primatelja i značajno poboljšava procese stvaranja i mineralizacije kostiju te smanjuje učestalost prijeloma.<sup>53</sup> Udio davateljevih stanica u ukupnom broju osteoblasta primatelja bio je 1,5–2%. Polariziranom svjetlosnom mikroskopijom i bojenjem toluidinskim modrilom potvrđeno je da kolagen stvaraju stanice davatelja. Tijekom vremena se pokazalo da je, unatoč inicijalnom porastu mineralizacije kostiju u oboljelih, učinak bio prolazan, što je pokazalo da samo transplantacija stanica koštane srži nije dovoljan terapijski zahvat. S obzirom na to da se pretpostavilo da su povoljni učinci transplantacije povezani s prihvaćanjem mezenhimske komponente koštane srži davatelja, uslijedila je druga klinička studija kojom se željela utvrditi uloga transplantiranih MMS u oporavku djece s OI. Šest mjeseci nakon transplantacije alogene koštane srži djeci su infundirane umnožene alogene MMS koje su prethodno bile označene

genskim biljezima kako bi se razlikovale od onih podrijetlom iz transplantirane koštane srži. Označene MMS pronađene su u kostima primatelja. Iako je utvrđena povezanost infuzije MMS s ubrzanim rastom djece, terapijski učinak bio je opet kratkoročan, a ukupan broj osteoblasta u primatelja bio je manji od 1%.<sup>46</sup>

Budući da je u oba istraživanja prihvaćanje mezenhimske komponente bilo kratkoročno, postavilo se pitanje povezanosti prihvaćanja MMS u kostima i poticanja rasta njihovom diferencijacijom u osteoblaste. Pretpostavilo se da MMS više djeluju posredstvom topljivih čimbenika koji potiču regeneraciju oštećenog tkiva i/ili prilagođavaju lokalni mikrookoliš u smjeru poticanja regenerativnog djelovanja nego u doslovnom smislu regenerativnih matičnih stanica.<sup>54</sup> Stoga su u trećoj kliničkoj studiji grupe Horwitza i suradnika prezentiranoj na *2nd regional meeting of ISCT* (2010., Italija) djeca oboljela od OI primila mononuklearne stanice iz koštane srži koje ne prijanaju na plastičnu podlogu (engl. *nonadherent marrow cells*). Na temelju rezultata dobivenih na životinjskim modelima i na temelju preliminarnih rezultata ove kliničke studije zaključeno je da osteoprogenitori iz populacije neadherirajućih stanica koštane srži stvaraju potomstvo osteoblasta, dok, s druge strane, MMS luče »tihog posrednika« koji potiče proliferaciju hondrocita i sintezu kolagena i tako djeluju na lokalni mikrookoliš. Stoga se na temelju tih rezultata pretpostavilo da u koštanoj srži postoje dvije stanične vrste koje čine osnovu za ovaj tip stanične terapije.

Ova istraživanja nedvojbeno pokazuju postojanje različitih mezenhimskih progenitora te da izbor specifične stanične populacije može biti ključan čimbenik za klinički ishod. Transplantacija MMS obećavajući je oblik stanične terapije za bolesti mezenhimskih tkiva, i to osobito koštanih bolesti. Glavni problem ovog načina liječenja i dalje ostaje prolaznost učinka terapije. Taj se problem može djelomično prevladati primjenom druge infuzije MMS u razmaku od šest mjeseci, čime se postiže poboljšanje praćenih parametara u bolesnika.<sup>51</sup>

### Dijabetes tipa I

Imunomodulatorna svojstva i njihova niska imunogenost čine MMS potencijalno primjenjivima i u slučajevima refraktornih autoimunskih bolesti.

Dijabetes tipa I autoimunosna je bolest koju karakterizira uništavanje β-stanica gušterače posredstvom limfocita T. Osnovna terapija u takvim je slučajevima primjena inzulina. Međutim, metabolička kontrola razine inzulina jest problem, kao i činjenica da egzogeno primjenjivan inzulin ne može potpuno nadomjestiti njegovo fiziološko lučenje.<sup>55</sup> Transplantacija otočica gušterače od preminulih davatelja za sada je jedini oblik liječenja kod krajnje uznapredovale bolesti. Problemi pri tomu jesu dostupnost davatelja i dodatne komplikacije uzrokovane samom transplantacijom.<sup>55</sup> U tom smislu, stanična je terapija zanimljiv pristup u osmišljavanju novih oblika liječenja ovog tipa dijabetesa. Mnogi pokušaji koji su uključivali manipulacije s KMS za sada nisu postigli veći uspjeh.<sup>56,57</sup> U posljednje vrijeme isti su se pokušaji usredotočili na diferencijaciju MMS *in vitro* u stanice koje proizvode inzulin.<sup>55</sup> Yuan H. i sur. (2009.) transkribirali su MMS štakora s cDNA gena *Pdx1* (engl. *pancreatic duodenal homeobox 1; Pdx1*) koji igra bitnu ulogu u razvoju fenotipa stanica koje luče inzulin.<sup>58</sup> Na taj su način u uvjetima *in vitro* uspjeli u transkribiranim MMS potaknuti razvoj fenotipa β-stanica i njihovu organizaciju u strukture nalik otočićima u gušterači te nestabilnu proizvodnju inzulina.<sup>58</sup> Ti

su rezultati tek početni koraci koje nakon razvoja stabilnog *in vitro* modela treba primijeniti u modelu *in vivo*. No, navedeni nalazi svakako zaslužuju više pažnje i dodatna ispitivanja u budućnosti.

### Opekline uzrokovane radioaktivnim zračenjem

Terapija s MMS predstavlja obećavajući je oblik liječenja i teških oštećenja kože i mišićnog tkiva koja su uzrokovana radioaktivnim zračenjem. Za razliku od liječenja termalnih opekline ili onih zadobivenih električnim udarom, opekline zadobivene radioaktivnim zračenjem teže se liječe konvencionalnim terapijskim postupcima. U takvim slučajevima patofiziološki procesi popraćeni su nepredvidljivim upalnim procesima koji sežu u dubinu tkiva i potiču nekrotičke procese te su popraćeni nekontroliranom boli. Primjena MMS novi je koncept liječenja takvih oštećenja, ponajprije zbog regenerativnog potencijala stanica i lučenja čimbenika koji mogu ublažiti lokalnu upalu te potaknuti angiogenezu. Lataillade i suradnici<sup>59,60</sup> opisali su dva klinička slučaja: incident u Čileu 2005. g. i incident u Dakaru 2006. g. U oba slučaja oštećeno tkivo u ozračenih bolesnika nadomješteno je zdravim autolognim kožnim presatkom i lokalno tretirano autolognim MMS umnoženim iz uzoraka koštane srži. Zahvati nisu bili praćeni negativnim popratnim pojavama, upalni su procesi zaustavljeni, a uspješan oporavak bolesnika praćen je tijekom dvije godine od zahvata.

### Oštećenje miokarda

Područje liječenja miokarda oštećenog infarktom primjenom autolognih KMS iz koštane srži intenzivno se istražuje. Pri tome se ispituje i primjena KMS koje potječu iz drugih tkivnih odjeljaka poput krvi iz pupkovine. No, rezultati su pokazali da KMS koje potječu iz koštane srži u ovakvim slučajevima daju bolje rezultate u smislu neovaskularizacije i kontraktilnosti novonastalih stanica. Bolji oporavak miokarda pripisuje se većoj količini MMS u koštanoj srži nego u krvi iz pupkovine.<sup>61</sup> Pravi mehanizam djelovanja MMS u oporavku oštećenog miokarda i njihova klinička primjena danas se intenzivno ispituje.<sup>62-64</sup>

## Umjesto zaključka

Terapija primjenom MMS daje vrlo obećavajuće rezultate u liječenju GvHD i OI. U posljednje vrijeme primjena MMS ispituje se u većem broju bolesti koje u etiologiji imaju imunolosnu podlogu. Trenutačna i buduća istraživanja u tom smislu usmjerena su na standardizaciju uvjeta uzgoja stanica, pronalaženje najboljih tkivnih izvora, identifikaciju specifičnih biljega te razvoj odgovarajućih *in vivo* modela radi ispitivanja preživljenja, udomljavanja i imunosupresivnog učinka MMS nakon transplantacije. Bolje poznavanje bioloških značajki i mehanizama djelovanja MMS nesumnjivo će omogućiti njihovu širu kliničku primjenu.

## LITERATURA

1. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med* 2003;3(3):140-9.
2. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotropic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
3. Friedenstein AJ, Gorskaia JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5):267-74.
4. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR i sur. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980;150:294-307.

5. *Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnik G i sur.* Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980;56(2):289–301.
6. *Caplan AI.* Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–50.
7. *Aerts F, Wagemaker G.* Mesenchymal stem cell engineering and transplantation. U: *Nolta JA, ur.* Genetic engineering of mesenchymal stem cells. Dordrecht: Springer; 2006, str. 1–44.
8. *Bieback K, Eichler H.* Human Mesenchymal Stromal Cells. U: *Areman EM, Loper K, ur.* Cellular Therapy: Principles, Methods and Regulations. Bethesda: AABB 2009;448–66.
9. *Lu LL, Liu YJ, Yang SG i sur.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematology* 2006;91:1017–26.
10. *Nauta AJ, Fibbe WE.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110(10):3499–506.
11. *Friedenstein AJ.* Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56(Suppl 1):S17.
12. *Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ.* Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3213–8.
13. *Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI.* Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13(1):69–80.
14. *Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG.* Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 2001;28(2):174–81.
15. *Zuk PA, Zhu M, Ashjian P i sur.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279–95.
16. *Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J.* Concise review: Mesenchymal stem cells; their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739–49.
17. *Owen M, Friedenstein AJ.* Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;(136):42–60.
18. *Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC i sur.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143–7.
19. *Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.* Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4(4):415–28.
20. *Wakitani S, Saito T, Caplan AI.* Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18(12):1417–26.
21. *Zhang YN, Lie PC, Wei X.* Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytother* 2009;11(5):548–58.
22. *Mareschi K, Rusticelli D, Comunanza V i sur.* Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. *Cytother* 2009;11(5):534–47.
23. *Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC i sur.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65(8):3035–9.
24. *Barlow S, Brooke G, Chatterjee K i sur.* Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008;17(6):1095–107.
25. *Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW.* Mesenchymal stem cells: paradoxes of passing. *Exp Hematol* 2004;32(5):414–25.
26. *Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57(1):11–20.
27. *Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M i sur.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10):3838–43.
28. *Troeger A, Meisel R, Moritz T, Dilloo.* Immunotherapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – not just a case for effector cells. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:59–64.
29. *Ramasamy R, Ringden O, Sundberg B, LeBlanc K.* Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplant* 2003;76:1208–13.
30. *Lazarus HM, Koc ON, Devine SM i sur.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(5):389–98.
31. *Ringden O, Labopin M, Gorin NC i sur.* Treatment with granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia increases the risk of graft-versus-host disease and death: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2004;22(3):416–23.
32. *Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM i sur.* Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematology* 2009;94(10):1649–60.
33. *Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE i sur.* High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009: article ID 789526.
34. *Bacigalupo A.* Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17:387–99.
35. *Dominici M, LeBlanc K, Mueller I i sur.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother* 2006;8(4):315–7.
36. *Koç ON, Peters C, Aubourg P i sur.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999;27(11):1675–81.
37. *Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K i sur.* Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 2007;47(8):1426–35.
38. *Le Blanc K, Frassoni F, Ball L i sur.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579–86.
39. *Von Bonin M, Stozel F, Goedecke A i sur.* Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(3):245–51.
40. *Zappia E, Casazza S, Pedemonte E i sur.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106(5):1755–61.
41. *Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62(13):3603–8.
42. *Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI.* The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cell Tissues Organs* 2001;169:12–20.
43. *Zonta S, De Martino M, Bedino G i sur.* Which Is the Most Suitable and Effective Route of Administration for Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation Therapy in Experimental Kidney Transplantation: Endovenous or Arterial? *Transplant Proc* 2010;42(4):1336–40.
44. *Lataillade JJ, Doucet C, Bey E i sur.* New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen med* 2007;2(5):785–94.
45. *Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI.* Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557–64.
46. *Horowitz EM, Gordon PL, Koo WW i sur.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:8932–7.
47. *Galotto M, Berisso G, Delfino L i sur.* Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 1999;27:1460–66.
48. *Koç ON.* Clinical trials of human mesenchymal stem cells to support hematopoietic stem cell transplantation. U: *Nolta JA, (ur.)* Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells. Nizozemska; Springer;2006: 151–62.
49. *Lazarus HM, Koc ON, Devine SM i sur.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(5):389–98.
50. *Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM.* Cell therapy for disorders of bone. *Cytother* 2009;11(1):3–17.
51. *Horwitz EM, Gordon PL.* Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for children with severe osteogenesis imperfecta. U: *Nolta JA, ur.* Genetic engineering of mesenchymal stem cells. Dordrecht: Springer; 2006, str. 135–50.
52. *Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV i sur.* Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:1142–7.
53. *Horowitz EM, Prokop DJ, Fitzpatrick LA i sur.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Mat Med* 1999;5:309–13.
54. *Horwitz EM, Prather WR.* Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: Expanding the spectrum of cell therapy. *Isr Med Assoc J* 2009;11(4):209–11.
55. *Vija L, Farge D, Gautier JF i sur.* Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2009;35(2): 85–93.
56. *Koblas T, Mitchell Harman S, Saudek F.* The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev Diabetic Stud* 2005;2:228–34.
57. *Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA.* Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 2008;36(6):710–15.

58. Yuan H, Li J, Xin N, Zhao Z, Qin G. Expression of Pdx1 mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Mol Biol Rep* 2010 Mar 21 (Epub ahead of print).
59. Bey E, Duhamel P, Lataillade JJ, de Revel T, Carsin H, Gourmelon P. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med* 2007;191(6):971–8.
60. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E *i sur*. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen med* 2007;2(5):785–94.
61. Ma N, Ladilov Y, Kaminski A *i sur*. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 2006;38:771–3.
62. Tan G, Shim W, Gu Y *i sur*. Differential effect of myocardial matrix and integrins on cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2010 Mar 20. (Epub ahead of print)
63. Li Q, Turdi S, Thomas DP, Zhou T, Ren J. Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction. *Toxicol Lett* 2010 Mar 18. (Epub ahead of print)
64. Noort WA, Feye D, Van Den Akker F *i sur*. Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results. *Panminerva Med* 2010 Mar;52(1):27–40.

## COCCYGODYNIA: ETIOLOGIJA, PATOGENEZA, KLINIČKE KARAKTERISTIKE, DIJAGNOZA I TERAPIJA

### COCCYGODYNIA: ETIOLOGY, PATHOGENESIS, CLINICAL CHARACTERISTICS, DIAGNOSIS AND THERAPY

VJEKOSLAV GRGIĆ\*

**Deskriptori:** Trtična kost – patologija, radiografija; Bol – etiologija, dijagnoza, liječenje

**Sažetak.** Naziv »coccygodynia« (kokcigodinija) znači bol u području trtične kosti (os coccygis; kokcigis). Zbog intolerancije sjedenja kokcigodinija može značajno narušiti kvalitetu života. Kokcigealni poremećaji koji se mogu manifestirati kokcigodinijom jesu: ozljede (fraktura, sublaksacija, luksacija), abnormalna pokretljivost (hipermobilnost, anteriorna i posteriorna sublaksacija ili luksacija kokcigisa), degeneracija diska u sakrokoccigealnom (SK) i interkokcigealnim (IK) segmentima, kokcigealna spikula (koštana izraslina), osteomijelitis i tumori. Abnormalna pokretljivost kokcigisa, koja se može vidjeti na dinamičkom rendgenogramu (lateralne slike kokcigisa u stojećem i sjedećem položaju), najčešći je patološki nalaz u bolesnika s kokcigodinijom (70% bolesnika). Ona može biti posljedica ozljede te kroničnoga statičkog i dinamičkog preopterećenja kokcigisa (pretilost, prolongirano sjedenje, biciklizam, veslanje, jahanje i dr.). Kokcigealno podrijetlo boli može se potvrditi injekcijama lokalnog anestetika u strukture koje mogu biti izvorište boli (SK disk, prvi IK disk, Waltherov ganglij, mišićna hvatišta oko vrška kokcigisa i dr.). Ekstrakoccigealni poremećaji koji se mogu manifestirati kokcigodinijom jesu: pilonidalna cista, perianalni apsces, hemoroidi, bolesti zdjelčnih organa te poremećaji lumbosakralne kralježnice, sakroilijakalnih zglobova, mišića piriformisa i sakruma. U oko 30% bolesnika s kokcigodinijom ne može se otkriti uzrok boli (idiopatska kokcigodinija). Terapija kokcigodinije može biti konzervativna i kirurška (parcijalna ili totalna kokcigektomija). Konzervativna terapija uključuje: mirovanje, medikamentnu terapiju, akupunkturu, jastuk za bolnu trticu, fizikalnu terapiju, manualnu terapiju (masaža i istezanje mišića podizača čmara; mobilizacija kokcigisa) i terapijske intervencije (injekcije lokalnog anestetika i kortikosteroida u bolne strukture; radiofrekventna ablacija kokcigealnih diskova i Waltherova ganglija). Primjenom različitih modaliteta konzervativne terapije, u većine bolesnika s kokcigodinijom postižu se zadovoljavajući rezultati. Kokcigektomija je indicirana u refrakternim slučajevima, ponajprije u bolesnika s abnormalnom pokretljivošću kokcigisa i spikulama koji najbolje reagiraju na kirurški tretman.

**Descriptors:** Coccyx – pathology, radiography; Pain – etiology, diagnosis, therapy

**Summary.** The term 'coccygodynia' means the pain in the tailbone area (os coccygis; coccyx). Due to the sitting intolerance, coccygodynia can significantly disturb the quality of life. Coccygeal disorders that could be manifested in coccygodynia are injuries (fracture, subluxation, luxation), abnormal mobility (hypermobility, anterior and posterior subluxation or luxation of the coccyx), disc degeneration at sacrococcygeal (SC) and intercoccygeal (IC) segments, coccygeal spicule (bony excrescence), osteomyelitis and tumors. Abnormal mobility of coccyx, which can be seen on dynamic radiograph (lateral X-rays of the coccyx in the standing and sitting position), is the most common pathological finding in patients with coccygodynia (70% of patients). It can be a result of an injury and chronic static and dynamic overload of the coccyx (obesity, prolonged sitting, bicycling, rowing, riding etc). Coccygeal origin of the pain can be confirmed by injections of the local anesthetic in the structures that can be a source of the pain (SC disc, first IC disc, Walther's ganglion, muscle attachments around the top of the coccyx etc). Extracoccygeal disorders that can be manifested by coccygodynia are: pilonidal cyst, perianal abscess, hemorrhoids, and diseases of pelvic organs as well as disorders of lumbosacral spine, sacroiliac joints, piriformis muscle and sacrum. In 30% of patients with coccygodynia, the cause of pain cannot be found (idiopathic

\* Privatna liječnička ordinacija (Vjekoslav Grgić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. V. Grgić, Privatna liječnička ordinacija, Bosanska 10, 10000 Zagreb, e-mail: vjekoslav.grgic@zg.t-com.hr  
Primljeno 29. travnja 2011., prihvaćeno 30. studenoga 2011.