

Využitie kmeňových buniek kostnej drene pri hojení chronických kožných rán – review

MUDr. Lucia Lakyová, PhD., prof. MUDr. Jozef Radoňák, CSc.

I. chirurgická klinika Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura, Košice

Práca je zameraná na skúmanie efektivity a bezpečnosti autológnej transplantácie buniek kostnej drene na urýchlenie hojenia chronických rán. Cieľom experimentov tejto novej liečebnej modalita je zistiť schopnosť migrácie kmeňových buniek, ich inkorporácie do spodiny rany a stimulácie hojenia rany. Kmeňové bunky poskytujú možnosť obnovy niektorých štruktúr a rekonštitúcie poškodeného tkaniva, pretože sú zodpovedné za orientáciu a ich diferenciáciu na špecifické bunky rozličných tkanív. Nie všetky štúdie sú však pri aplikácii kmeňových buniek u pacientov také optimistické. Otázne je, či nové kožné bunky regenerované pomocou kmeňových buniek sú aj funkčné. Labilita fenotypu týchto buniek môže viesť k poškodeniu štruktúry alebo funkcie, dokonca môže viesť až k malignite. Aplikácia kmeňových buniek podľa niektorých autorov vraj môže daný klinický stav aj zhoršiť. Napriek týmto niektorým výsledkom v experimentálnej rovine zaznamenalo použitie kmeňových buniek v hojení chronických rán veľký ohlas aj na klinickej úrovni.

Kľúčové slová: kmeňové bunky kostnej drene, chronická rana, hojenie.

The use of stem bone marrow cells in healing of chronic skin wounds

Article is directed at investigation of efficacy and safety of autologous transplantation of bone marrow - cells in improvement of wounds healing. The aim of the experiments of this new treatment method is to determinate the ability of migration of stem cells, implantation into wound bed, differentiation and stimulation of healing process. Stem cells offer the possibility that some structures within the wound may be reconstituted, because they are responsible for the homing of stem cells and their differentiation into specific tissue-related cells. Not all of the studies of applied bone marrow cells in patients achieved so optimistic results. It is not known whether these new skin cells regenerated by stem cells are functional. Instability of cellular phenotypes may lead to the deterioration of the structure and/or function of tissues, and may eventually give rise to malignant cells. Application of stem cells makes clinical status worse according to some authors. Despite of these results in experimental level it was noticed the huge reply the use of stem cells in healing of chronic wounds in the clinical field.

Key words: stem bone marrow cells, chronic wound, healing.

Slov. chir., 2013; roč. 10(2): 48–51

Úvod

Malé kožné rany sa hoja u zdravých pacientov väčšinou bez ťažkostí. Väčšie lézie zasahujúce plnú hrúbku kože alebo popáleniny vyžadujú dlhší čas liečby, pričom výsledkom tohto hojenia môže byť aj excesívna jazva. Liečba chronických rán je neustály klinický problém a predstavuje veľkú socio-ekonomickú záťaž pre spoločnosť.

Napriek doterajšiemu rýchlemu pokroku v liečbe rekombinantnými rastovými faktormi a bioinžinierstvom kože, až 50 % rán je rezistentných na liečbu (1). Použitie autológnych štepov je limitované množstvom kože dostupnej pre grafting (2). Novým prístupom v liečbe týchto rán je využitie kmeňových buniek kostnej drene za účelom urýchlenia hojenia rán (3). Tento mechanizmus urýchlenia hojenia spočíva v utlmení preexponovanej zápalovej reakcie, interakcii s vaskulárnymi endoteliálnymi bunkami, parakrinným systémom a v imunomodulácii. Predpokladaným výsledkom takejto liečby je rýchlejšie zahojenie a eliminácia tvorby nadmerného fibrózneho tkaniva.

Cieľom množstva štúdií zaoberajúcich sa touto metodikou je zistiť na zvieracom modeli, či kmeňové bunky majú potenciál priniesť zásadné zmeny do reparačného procesu a či sa dajú využiť aj terapeuticky

u ľudí. Existuje totiž množstvo liečebných postupov, ktoré aplikujú kmeňové bunky, avšak väčšina z nich sa nachádza predovšetkým v experimentálnej rovine a sú nákladné. Za posledné obdobie sa vyvinulo množstvo protokolov, aby dosiahli čo najvyššiu úspešnosť uchytenia sa a diferenciácie kmeňových buniek v ranách. Mierou úspešnosti liečby je, aby sa tieto bunky dostali do lôžka rany v čo najvyššom počte a tak maximalizovali ich terapeutický benefit.

Cieľom tohto prehľadového článku je priblíženie základných metód a stratégií pri používaní kmeňových kostných buniek v experimente a pri klinickej aplikácii.

Problematika hojenia rán

Narušené hojenie rán je charakterizované excesívnou infiltráciou polymorfonukleárných leukocytov, nedostatočnou formáciou granulačného tkaniva, deficitom kolagénu a expresiou rastových faktorov (TGF-beta, epidermálny rastový faktor (EGF), vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), doštičkový derivovaný rastový faktor (PDGF-BB) a keratinocytový rastový faktor (KGF)). Biomechanická pevnosť rany je tak signifikantne znížená (4). Poruchy hojenia rán sú teda multifaktoriálne a sú dôsledkom porúch ciev zahrňajúcich 1. mikro- a makroangiopatiu,

2. abnormálne zápalové pochody, 3. periférnu neuropatiu a poruchy funkcie granulocytov, makrofágov a keratinocytov (5).

1. Makro- a mikroangiopatia. Trofické zmeny kože pri zlom arteriálnom zásobení bývajú spôsobené progresívnou tkanivovou hypoxiou, a to v dôsledku extramurálnej strangulácie, murálneho zhrubnutia, nánosov a intramurálnej reštrikcie krvného toku. Extramurálna strangulácia nastáva v dôsledku formovania jazvového tkaniva. Murálne zhrubnutie alebo akrcia intimálnych plakov (napr. pri ateroskleróze) postupne progreduje so stále sa zhoršujúcim krvným prietokom až kým aterosklerotická, embólia alebo navodená infekcia nespôsobí kompletnú oklúziu vyúsťujúcu do ulcerácie. Intramurálne zmeny okludujú malé cievy so zmenami v krvnej viskozite, adhezii doštičiek a s fibrinogénou napr. pri vaskulitide. To je príčinou vzniku ulcerácií. Patogenéza nemôže byť často exaktne definovaná pre výskyt prekrývajúcich sa príčin. Teoreticky tkanivová hypoxia by mala spôsobiť kompenzátnu angiogénu cestou fyziologickej spätnej väzby indukciou hypoxiou indukovaného faktora alpha (HIF-1α) a angiogénických rastových faktorov. U pacientov s periférnou artériovou chorobou je v sére dvojnásobne zvýšený hepacytový rastový faktor v porovnaní so zdravými

pacientmi. Tkanivá poškodené závažnou makro-vaskulárnou chorobou majú vyčerpanú angiogenic-kú reakciu. Interindividuálne rozdiely v schopnosti angiogenézy v hypoxických podmienkach takisto existujú aj medzi pacientmi s aterosklerózou. Takéto variácie vysvetľujú, prečo niektorí pacienti s periférnou arteriálnou chorobou sú neschopní vytvorenia adekvátnej kolaterálnej cirkulácie a prečo sa niekedy nehoja arteriálne ulkusy napriek chirurgicky vytvorenému bypassu. Pri mikroangiopatii je hlavným problémom zhrubnutie bazálnych membrán kapilár, tieto sú priepustnejšie pre plazmatické proteíny ako normálne. V dôsledku toho vzniká edém, ktorý takisto narušuje priebeh hojenia rán (6, 7, 8).

2. Abnormálne zápalové pochody. Pri chronických ranách býva nepriaznivo zmenený aj zápalový proces. Keďže zápalový proces je súčasťou procesu hojenia rany, alterácie zápalového procesu majú vplyv na celkový priebeh hojenia rany. Porušené sú všetky deje, ktorými sa zápalové bunky podieľajú na hojení rany: adhérenca k stene krvných ciev, diapedéza, chemotaxia a takisto fagocytóza. Leukocyty preukazujú porušenú schopnosť deformovať sa v dôsledku zmien v ich bunkovej membráne. Ďalšia z možných príčin vedúcich k oslabeniu rezistencie voči infekcii je zvýšená tendencia kože k prasknutiu, čo vedie k zvýšenej možnosti baktérií kolonizovať vzniknuté trhliny.

3. Hlavným zdrojom problémov diabetických pacientov s hojením rán je vznik diabetickej neuropatie. Táto periférna neuropatia zahŕňa všetky typy nervov. Poškodenie nervov môže vychádzať z metabolických abnormalít, ako je aj akumulácia sorbitolu v perineurálnom priestore, čo môže viesť k edému, a podiel tu zohráva aj poškodenie endoneurálnych malých ciev. U diabetických pacientov je takisto prítomná demyelinizácia Schwannových buniek, čo môže byť dôsledkom redukovanej rýchlosti vedenia v ich nervoch. Ďalej je možné, že poškodenie sa vzťahuje na abnormality v metabolizme myo-inozitolu. Diabetes ovplyvňuje priamo aj keratinocyty, u ktorých bolo nájdené vylučovanie zníženého množstva rastových faktorov u diabetických myší (9).

Definícia kmeňových buniek kostnej drene

Kmeňové bunky kostnej drene boli charakterizované prácami Ernesta A. McCullocha a Jamesa E. Tilla (10, 11) ako bunky s prolongovanou schopnosťou sebaobnovy (t. j. produkujúce sami seba) a schopnosti sa diferencovať do zreých štádií rozličných tkanív pomocou asymetrickej replikácie (12, 13, 14). Táto schopnosť sa označuje ako multipotencia, teda môžu byť zdrojom všetkých typov buniek a naopak, kmeňové bunky jednotlivých orgánov môžu vytvárať bunky kostnej drene. Kmeňové bunky sa delia na dve línie: hematopoetické kmeňové bunky

a mezenchymálne kmeňové bunky – MKB (15). MKB sú klonové prekurzory nehematopoetických tkanív. Je to zriedkavá populácia buniek v kostnej dreni, reprezentujúca iba 0,001 – 0,01 % jadrových buniek, čiže je ich 10-násobne menej než hematopoetických buniek. Zabezpečujú regeneráciu prirodzene starších a poškodených tkanív. Za určitých okolností kmeňové bunky môžu dokonca omladiť respektíve prestavať tkanivo. Sú expandabilné v kultúre, sú multipotentné, a schopné diferencovať sa na osteoblasty, chondrocyty, astrocyty, pneumocyty, hepatocyty, neuróny a myocyty (16). Kmeňové bunky pri interakcii s tkanivom sú taktiež spúšťačom rôznych rastových faktorov (17).

Mechanizmus účinku pôsobenia kmeňových buniek kostnej drene v rane

Liečba kmeňovými bunkami kostnej drene signifikantne spôsobuje zvýšenie tvorby kolagénu I. – IV., čo zlepšuje pevnosť rany (4) a efektívnejšiu depozíciu kolagénových vlákien (18), vzhľadom na zlepšenú pevnosť rany oproti kontrolnej skupine (52 % vs. 31 %). Histologická analýza potvrdzuje signifikantnú redukciu lokálnej zápalovej reakcie a supresie CD45. Imunohistochemická analýza signifikantne zvyšuje epidermálny rastový faktor, vaskulárny endoteliálny rastový faktor, prolyl 4-hydroxylázu, a expresiu Ki-67 (19).

Základnou otázkou je, ako je možné, že kmeňové bunky sú schopné diferencovať do rozličných buniek? Pravdepodobne tieto mnohopočetné línie kmeňových buniek sa môžu premeniť nezávisle na ich analógnych zreých tkanivách, alebo primitívne dospelé multipotentné kmeňové bunky zvýšia svoju diferenciáciu schopnosť, a tak línie kmeňových buniek môžu vyzrieť. Ja taktiež možné, že kmeňové bunky, ktoré dostanú príkaz sa diferencovať do niektorých z línií sa môžu presunúť do inej pod vplyvom signálov a lokálneho mikroprostredia (20). Ying et al. a Terada et al. zistili, že dospelé kmeňové bunky sú schopné spontánnej fúzie s embryogenickými kmeňovými bunkami, čo mení ich vlastnosti a následne sa to mylne interpretuje ako transdiferenciácia. Tento dej sa dokázal zatiaľ iba *in vivo* prostredím (21, 22).

Kmeňové bunky alebo progenitorové bunky sú priťahované do rany signálmi vychádzajúcimi z miesta poranenia. Zistilo sa, že prostredie, v ktorom sú umiestnené kmeňové bunky (teda počet buniek, spôsob aplikácie, koncentrácia kyslíka) ovplyvňuje expresiu povrchových receptorov kmeňových buniek, ktoré odpovedajú na signály pre migráciu. Čerstvo izolované kmeňové bunky majú vyššiu schopnosť uchytenia sa v cieľovom tkanive pri porovnaní s ich kópiami zmnoženými v kultúrach (23). Receptor CXCR4 a chemotaktický receptor (SDF-1 α), ktorý je

viazaný v kostnej dreni a v ischemických tkanivách, chýba na povrchu kmeňových kostných buniek pomnožených v kultúre (24). Zistilo sa však, že pokiaľ sú kmeňové bunky umiestnené v kokteile z cytokínov, kmeňové bunky vykazujú expresiu CXCR4. Vystavenie kmeňových buniek hypoxickým podmienkam taktiež zvyšuje expresiu CXCR4 a CX3 chemokínového receptora 1 (CX3CR1), čo vedie k zvýšenej migrácii. Rosová et al. demonštrovala, že kmeňové bunky pestované v hypoxických podmienkach aktivujú signálnu Akt cestu, pričom sa udržiava aj ich životaschopnosť a počet bunkových cyklov (25). Expresia CXCR4 sa dá zvýšiť aj retrovírusovou expresiou, prenosom mRNA, alebo pridaním cytokínu TNF- α .

U ľudí sa poranenie kože a iných tkanív nehojí regeneráciou, ale jazvou. Autori, ktorí aplikujú mezenchymové kmeňové bunky do takýchto kožných rán tvrdia, že tieto bunky dokážu prispieť k vytvoreniu novej epidermis, vlasových folikulov, mazových žliaz a iných zložiek celej hrúbky kože, čiže prispievajú k regenerácii. Avšak štúdie, ktoré pozorovali prítomnosť nových epiteliálnych buniek po aplikácii mezenchymových kmeňových buniek v rane, zaznamenali pomocou zeleného fluorescentného proteínu (GFP) iba obmedzenú prítomnosť epiteliálnych buniek po štyroch týždňoch. Je to pravdepodobne v dôsledku ich rapidnej premeny počas hojenia. Toto pozorovanie vysvetľuje, že kostná dreň nepodporuje dlhotrvajúcu sebaobnovu kmeňových buniek na dermálne keratinocyty. Naopak, v rane sa objavuje signifikantne vysoké množstvo buniek regenerujúcich appendixy kože bohaté na Ki67-pozitívne deliace sa bunky. Tieto štruktúry sú formované endogénnymi keratinocytmi, ktoré sú ovplyvniteľné parakrinnými faktormi vylučovanými kmeňovými mezenchymovými bunkami. Tieto hrajú taktiež dôležitú úlohu v regenerácii kože.

Pestovanie a kultivovanie kmeňových buniek

Princípom získania aplikovateľných kmeňových buniek je izolácia čistých definovaných bunkových línií v dostatočnom množstve a ich expanzia. Prietoková cytometria kombinovaná s rozvojom nových protilátok pomáha zlepšiť čistotu bunkových línií a vytvoriť rýchlejšiu multiparametrickú analýzu. V súčasnosti existujú hotové kity, ktoré zlepšujú a urýchľujú izoláciu buniek, ich priamu kvantifikáciu a analýzu vrátane predtrotovaných fluorochrómových protilátok na povrchové receptory buniek, transkripčné faktory a pufre. Kvalitné monoklonové protilátky sú kľúčom ku konzistentným a reprodukovateľným výsledkom. Povrchové markery sú používané na fenotypizáciu a izoláciu kmeňových buniek. MSC na klinické použitie sa musia zbierať a expandovať *ex vivo* v určitých podmienkach s filtrovaným laminárnym

prúdením vzduchu a kontrolovaným prístupom za absolútne sterilných podmienok, a početných mikrobiologických, virologických, imunologických, imunofenotypových a funkčných kontrol kvality (26).

Po odbere kostnej drene sa frakcia kmeňových buniek získa pomocou separátora spôsobom diferenciálnej centrifugácie. Zvýši sa tak hustota frakcie buniek v suspenzii. Hustota je rozhodujúcim faktorom ovplyvňujúcim rast populácie po ich aplikácii. Koncentrácia buniek sa stanovuje kultiváciou v špecifických médiách alebo prietokovou cytometriou v médiu protilátok proti markerom, ktoré sú značené fluorescenčným farbivom. Je nutné si uvedomiť, že *ex vivo* množenie kmeňových buniek ovplyvňuje ich schopnosti ako je proliferácia kapacita, diferenciálny potenciál a trofická aktivita, a to v negatívnom zmysle (27).

Kostná dreň v experimente u malých zvierat (potkan, myš) sa odoberá z dlhých kostí dospelých jedincov. Na tento účel sa používajú dlhé kosti femuru a tibie odstránené za aseptických podmienok a očistené od väziva po eutanázii zvierat.

Ako aplikovať kmeňové bunky kostnej drene do rany?

Cieľom aplikácie buniek je dosiahnuť čo najvyššiu koncentráciu buniek v mieste rany. V zásade existujú dva základné spôsoby aplikácie buniek: infúzia buniek do cirkulácie (28), alebo priama aplikácia terapeutických buniek do rany – injikovaním alebo vložím kolagénovej špongie do rany.

Pri vaskulárnom podávaní MKB je riziko, že pri transporte buniek krvným riečiskom sa zachytia na miestach ako sú pľúca, slezina a pečeň. Pri intraarteriálnom podávaní sa používa intraarteriálne zavedený katéter na podanie autológnej frakcie MNC priamo do nepostihnutých distálnejších tepien. To vedie k výraznej redukcii počtu buniek v cieľovom tkanive. Cievy, ktoré vyživujú miesto poranenia nesmú byť trombotické, resp. poškodené, aby dovolili preniknúť bunkám do postihnutého miesta. Zistilo sa, že množstvo kmeňových buniek po aplikácii do systémového obehu sa zachytáva v pľúcach. Yukawa et al., navrhoval kombináciu kmeňových buniek s heparínom. Tento problém sa vyriešil len čiastočne, lebo kmeňové bunky sa u myši liečených heparínom následne vychytávali pečeňou (29). Bunky musia taktiež prestúpiť z cirkulácie do spojivového tkaniva, kde ich čaká hlavná úloha (30). Preto množstvo autorov preferuje priame umiestnenie buniek do rany. Ide napríklad o viacpočetné intramuskulárne vpichy do okolia trofického lézie. S intramuskulárnou aplikáciou sa začína asi 4 – 5 cm proximálne od miesta tepnovej obliterácie a pokračuje sa distálne. Niektorí používajú kombináciu systémového podania buniek s lokálnou aplikáciou.

Voľba metódy podania je na každom pracovisku iná, závisí od preferencie autorov.

Kožné rany sú optimálnym kandidátom na topické umiestnenie, pričom je množstvo spôsobov ako aplikovať kmeňové bunky kostnej drene do chronickej rany. Niektorí autori odporúčajú injikovať bunky intradermálne okolo rany, alebo do okrajov rany (31, 32). Stoff et al., injikovali koncentrované ľudské mezenchýmové bunky do incízných rán kože zajaca. Tieto bunky migrovali z miesta aplikácie cez dermo-epidermálne spojenie na 14. deň hojenia a dosiahli cieľové miesto rany až pri fascii na 21. deň. To dokazuje, že MKB sú schopné migrácie cez spojivové tkanivo (18). Nambu et al., liečil excízne rany u myši autológny kmeňovými bunkami, ktoré boli aplikované do kolagénovej matrice. Pozoroval nárast granulačného tkaniva a urýchlenú reepitelizáciu rany (33). Inou potenciálnou metódou na priamu aplikáciu buniek do rany je ich inkorporácia cez kožný ekvivalent. Typický dvojvrstvový kožný ekvivalent pozostáva z epidermy a dermis s fibroblastovým podkladom (34). Integrácia kmeňových mezenchýmových buniek do fibroblastovej matrice zvyšuje angiogenický potenciál matrice. Falaga et al. (9), použil fibrínový polymérny sprej na aplikáciu autológnych mezenchýmových buniek získaných z aspirátov kmeňových buniek na urýchlenie akútnej nehojajúcej sa kožnej rany, a to u človeka ako aj u myši. V tomto experimente sa pozoroval prienik buniek do lôžka rany na 21. deň po aplikácii. Tento spôsob reprezentuje uskutočniteľnú metódu na vloženie buniek do rany. Autor pozoroval silnú koreláciu medzi počtom úspešne implantovaných kmeňových buniek a rýchlosťou hojenia sa chronických rán. Sú však popisované aj nevýhody v súvislosti s touto technikou. Kmeňové bunky musia byť kultivované v dostatočnom počte pre lokálnu aplikáciu a pre pestovanie za účelom liečby. Načasovanie aplikácie buniek je taktiež dôležité, keďže bunky musia funkčne splynúť s bunkami v rane v kritickom čase hojenia.

Kmeňové bunky a imunitný systém

Miesta tkanivového poškodenia prechádzajú chronickými a akútnymi imunitnými odpoveďami a mezenchýmové bunky migrujúce do týchto miest sú ovplyvňované rôznymi imunitnými bunkami v lokálnom prostredí. Liu et al., našli cestu, ktorou komunikuje imunitný systém cez interferón (IFN)- γ a TNF- α s transplantovanými mezenchýmovými kmeňovými bunkami počas reparačného procesu. Systémová infúzia obsahujúca T bunky alebo lokálna administrácia acylpyrínu značne zvyšovali prežívanie transplantovaných kmeňových buniek v poškodenom mieste (35).

Za zmienku stojí aj fakt, že v niektorých experimentoch sa používali xenogenické bunky kostnej drene. Stoff et al., použil ľudské MKB v incízných

kožných ranách u králikov, ktoré boli plne imunokompetentné bez imunosupresívnej podpory a nebola zaznamenaná žiadna rejekcia injikovaných xenogenických MKB (18).

Allogenické MKB *in vitro* a *in vivo* podmienkach majú imunosupresívny efekt. Ľudské mezenchýmové kmeňové bunky suprimujú proliferáciu CD4+ a CD8+ T-buniek pomocou sekrecie faktorov ako je hepatocytový rastový faktor a naopak, tlmia sekreciu cytokínov dendritických buniek, T-buniek a prirodzených zabíjačov. Tento fenomén sa používal pri liečení rejekcie kožného transplantátu graft-versus-hostiteľ. Niektorí autori majú názor, že takýto efekt má pozitívny vplyv pri hojení kožných rán po aplikácii BMK na prevenciu vzniku opakovaného chronického zápalu rany. Negatívom je možnosť vzniku nádoru pri takejto liečbe, čo treba zvážiť najmä pri klinickom využití tejto liečby (36).

Diskusia

Kmeňové bunky poskytujú možnosť obnovy niektorých štruktúr a rekonštitúcie poškodeného tkaniva (5), pretože sú zodpovedné za orientáciu a ich diferenciáciu na špecifické bunky rozličných tkanív (37). Boli charakterizované na podklade nálezu Ernesta A. McCullocha a Jamesa E. Tilla (38, 39) ako bunky s prolongovanou schopnosťou sebaobnovy a schopnosti diferencovať sa do zreých štádií rozličných tkanív pomocou asymetrickej replikácie (40, 41). Za určitých okolností kmeňové bunky môžu dokonca omladiť respektíve prestavať tkanivo (42). Kmeňové bunky pri interakcii s tkanivom sú taktiež spúšťačom rôznych rastových faktorov (43). Sú schopné sekrecie cytokínov, ktoré podporujú angiogénu a inhibujú apoptózu (44, 45).

Niektoré štúdie na zvieratách ukázali, že kmeňové autológne derivované bunky môžu akcelerovali hojenie rán v plnej hrúbke kože u diabetických myši podobne ako v kontrolnej skupine zdravých myši (46). Podľa štúdie Kuo YR et al., kompletne zahojenie rany trvá u kontrolnej skupiny v priemere 9,8 týždňa, a u chronickej rany s aplikáciou kmeňových buniek 6,6 týždňa, čo predstavuje štatisticky signifikantný rozdiel (19).

Nie všetky štúdie sú však pri aplikácii kmeňových buniek u diabetických pacientov také optimistické. Schattelman et al., dokázali, že pri aplikácii kmeňových buniek z kostnej drene u starších myši do rany, sa hojenie skôr spomaľuje ako urýchľuje (41, 47). Podobné výsledky pozoroval aj Evangelos et al., u ľudí. Vo svojej práci pozoroval, že bunky derivované z kostnej drene od starších pacientov nie sú vhodné pre liečbu a dokonca môžu škodiť (46). V inej štúdii bolo dokázané na modeli myši, že mezenchýmové bunky kostnej drene od starších myši viac inhibujú ako urýchľujú hojenie rán, pokiaľ

sú aplikované do rán u diabetických myší (31). Inou potenciálnou cieľovou skupinou pre túto liečbu sú pacienti s ischemickými ranami. Pokiaľ niektoré štúdie tvrdia, že mezenchýmové bunky sú schopné diferenciácie na epitelové alebo vaskulárne endotelové bunky (48, 49), iné štúdie nepotvrdili tento efekt v ischemických ranách (50).

Je mnoho ďalších problémov, ktoré je nutné vyriešiť pred klinickou aplikáciou týchto kmeňových buniek. Údaje z doposiaľ publikovaných štúdií nie sú dostačujúce. Otázne je, či nové kožné bunky (vrátane keratinocytov, potných a mazových žliaz) regenerované pomocou kmeňových buniek sú aj funkčné. V porovnaní s dermálnymi fibroblastmi, či preadipocytmi sú však kmeňové bunky kostnej drene efektívnejšie pri epidermálnej regenerácii (51). Akokoľvek, tvárnosť kmeňových buniek je dvojsečnou zbraňou a labilita fenotypu môže viesť k poškodeniu štruktúry alebo funkcie, dokonca môže viesť až k malignite. Navyše, mechanizmus kontroly vyzrievania bunky je stále záhadou.

Záver

Klinické pozorovanie ako aj experimentálne práce potvrdzujú, že mezenchýmové kmeňové bunky kostnej drene podporujú liečbu chronických rán. Najčastejším predmetom výskumu je ako najefektívnejšie umiestniť bunky v cieľovom tkanive, aby dosiahli čo najvyššiu koncentráciu v rane. Ďalším predmetom výskumu je bunkový a molekulárny mechanizmus účinku týchto buniek v rane a aký je konečný osud týchto buniek po zahojení rany. Načasovanie liečby je taktiež dôležité, pretože bunkové populácie sa menia v závislosti od fázy reparačného procesu, teda od mikroprostredia. Porozumenie týmto procesom je dôležité na maximalizáciu ich liečebného potenciálu.

Práca vznikla v rámci riešenia výskumnej úlohy podporenej grantom VEGA 1/0689/11/9, a práce v Centre excelentnosti pre elektromagnetické polia v medicíne (CEEPM). Kód ITMS projektu 26220120067.

Literatúra

- Wu Y, Chen L, Scott P, Tredget E. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stemcells*. 2007;25:2648–2659.
- Boyce ST, Warden MD. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am J Surg*. 2002;183:445–456.
- Fioretti F, Lebreton-DeCoster C, Gueniche F, Youfi M, Humbert P, Godeau G, Senni K, Desmoulière A, Coulomb B. Human bone marrow-derived cells: an attractive source to populate dermal substitutes. *Wound Repair Regen*. 2008;16:87–94.
- Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, et al. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J*. 2008;5(3):453–463.
- Snyder RJ. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. *Clin Dermatol*. 2005;23:388–395.

- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg*. 1998;176:26–38.
- Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein MD, Hollier L. Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent, a new paradigm in wound healing. *Arch Surg*. 2000;135:627–634.
- Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002;288:2579–2588.
- Mansbridge JN, Liu K, Pinney RE, Patch R, Ratcliffe A, Naughton GK. Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes Obes Metab*. 1999;1:265–279.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452–454.
- Siminovich L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963;62:327–336.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157–168.
- Schatteman GC, Ma N. Old bone marrow cells inhibit skin wound vascularisation. *Stem cells*. 2006;24:717–721.
- Filip, Mokry S, Hruska J, Ivan. *Kmenové buňky – biologie, medicína, filozofie*. Praha: Galén; 2006.
- Yaojiong Wu, Jianfei Wang, Paul G. Scott, Edward E. Tredget. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Rep Reg*. 2007;15:18–26.
- Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus*. 2007;5(3):120–129.
- Lau K, Paus R, Tiede, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology*. 2009;18:921–933.
- Stoff NS, Moore ST, Numnum M, Espinosa-de-los-Monteros A, Richter DF, Siegal GP, Chow LT, Feldman D, Vasconez LO, et al. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Exp Dermatol*. 2009;18:362–369.
- Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(4):872–880.
- Lee JH, Kosinski PA, Kemp DM. Contribution of human bone marrow stem cells to the individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res*. 2005;307:174–182.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002;416:545–548.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416:542–545.
- Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 2003;7(1):160–170.
- Sackstein R, Merzaban JS, Cain DV, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature Medicine*. 2008;14(2):181–187.
- Rosová M, Dao B, Capoccia D, Link, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(8):2173–2182.
- European Commission – Health & Consumer Protection Directorate-General. Technical requirements for the coding, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. Directive 2004/23/EC.
- Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, et al. Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica*. 2010;95(1):47–56.
- Sorrell JM, Caplan AL. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Research & Therapy*. 2010;1:30, doi:10.1186/scrt30.
- Yukawa H, Watanabe M, Kaji N, et al. Monitoring transplanted adipose tissue-derived stem cells combined with heparin in the liver by fluorescence imaging using quantum dots. *Biomaterials*. 2012;33(7):2177–2186.
- Yamaguchi Y, Kubo T, Murakami T, Takahashi M, Hakamata Y, Kobayashi E, Yoshida S, Hosokawa K, Yoshikawa K, Itami S. Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing. *Br J Dermatol*. 2005;152:616–622.
- Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14:840–850.
- Hanson S, Bentz M, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;125:510–516.
- Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R, Nakamura SI, Kiyosawa T, Ishihara M, Kanatani Y. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg*. 2009;62:317–321.
- Fioretti F, Lebreton-DeCoster C, Gueniche F, Youfi M, Humbert P, Godeau G, Senni K, Desmoulière A, Coulomb B. Human bone marrow-derived cells: an attractive source to populate dermal substitutes. *Wound Repair Regen*. 2008;16:87–94.
- Liu Y, Wang T, Kikuri, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-γ and TNF-α. *Nature Medicine*. 2011;17(12):1594–1601.
- Sung Keun Kang, Seob Shin, Myung Soon Ko, Jung Youn Jo, Jeong Chan Sung Ra. Review Article Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*. 2012; Article ID 342968, 11.
- Korbling M, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 2002;346:738–746.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452–454.
- Siminovich L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963;62:327–336.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157–168.
- Schatteman GC, Ma N. Old bone marrow cells inhibit skin wound vascularisation. *Stem cells*. 2006;24:717–721.
- Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736–1743.
- Lau K, Paus R, Tiede S, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology*. 2009;18:921–933.
- Pons J, Huang Y, Takagawa J, Arakawa-Hoyt J, Ye J, Grossman W, Kan YW, Su H. Combining angiogenic gene and stem cell therapies for myocardial infarction. *J Gene Med*. 2009;11(9):743–753.
- Kang L, Chen Q, Wang L, Gao L, Meng K, Chen J, Ferro A, Xu B. Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(10):47–56.
- Evangelos V, Falanga V. Treatment of Chronic Wounds With Bone Marrow Derived Cells. *Arch dermatol*. 2003;139:510–516.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157–168.
- Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007;25:73–78.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 180:2581–2587.
- Deten A, Volz H, Clamors S, Leiblein, Briest W, et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovascular research*. 2004;65:52–63.
- Aoki S, Toda S, Ando T, Sugihara H. Bone marrow stromal cells, preadipocytes, and dermal fibroblasts promote epidermal regeneration in their distinctive fashions. *Mol Biol Cell*. 2004;15:4647–4657.

MUDr. Lucia Lakyová, PhD.

I. chirurgická klinika LF UPJŠ a UNLP
Trieda SNP 1, 040 01 Košice
lalucka@gmail.com