

# Mezenhimske matične stanice u veterinarskoj medicini



Nina Krešić\*, Ivana Šimić, Ivana Lojkić i Tomislav Bedeković

## Sažetak

Ubrzani razvoj regenerativne veterinarske medicine, usmjerene na iskorištavanje sposobnosti adultnih matičnih stanica i organizma za obnavljanjem oštećenih stanica, tkiva i organa, zahtijeva pouzdan izvor matičnih stanica. Masno tkivo predstavlja obilat, pristupačan i bogat izvor adultnih matičnih stanica koje pružaju brojne mogućnosti za aplikaciju u regenerativnoj veterinarskoj medicini. Mezenhimske matične stanice izdvojene iz masnog tkiva (adipose derived- mesenchymal stem cells -

AD-MSCs) adheriraju na plastiku, sposobne su se diferencirati u različite stanične linije (adipocite, osteoblaste, hondrocite, miocite, neuralne stanice), a detaljno se karakteriziraju ekspresijom specifičnih površinskih staničnih biljega. Zahvaljujući svojim osobinama i masnom tkivu kao zahvalnom izvoru, zanimanje za AD-MSCs raste u istraživačkim i kliničkim krugovima.

**Ključne riječi:** matične stanice; masno tkivo; terapijski potencijal; veterinarska medicina

## Uvod

Prisutnost nehematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži po prvi je put uočio njemački patolog Cohnheim 1867. godine. Pretpostavio je da uočene stanice, nalik fibroblastima, migriraju na mjesto ozljede gdje pomažu obnoviti oštećeno tkivo (Baer i Geiger, 2012.). Friedenstein i suradnici tek 1960-tih godina izdvajanjem, umnažanjem, i osteogenom diferencijacijom izdvojenih adultnih mezenhimskih matičnih stanica (engl. *mesenchymal stem cells* - MSCs) iz koštane srži otvaraju novo područje istraživanja matičnih stanica (Friedenstein i sur., 1966., Friedenstein i sur., 1968., Baer i Geiger, 2012.). Istraživanja koja su usli-

jedila pokazala su da MSC prijanjaju na plastiku, posjeduju potencijal za diferencijaciju u tri linije (adipocite, hondrocite i osteocite). Termin MSCs populariziran je tek 1990-tih godina.

Matične se stanice dijele na embrionalne i adultne matične stanice. Mezenhimske matične stanice (MSCs) definirane su kao adultne matične stanice mezodermalnog podrijetla i izvanredne plastičnosti. MSCs obitavaju u perivaskularnoj niši te se na taj način objašnjava njihova prisutnost u gotovo svim organima i tkivima. Smatra se da su izvedene od pericita, perivaskularnih stanica koje obavijaju endotelne stanice u

Dr. sc. Nina KREŠIĆ\*, dr. med. vet., asistentica (dopisni autor, email: lemo@veinst.hr), dr. sc. Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, prof. biol., znanstvena savjetnica, Ivana ŠIMIĆ, dr. med. vet., asistentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

krvnim žilama (Marx i sur., 2015.). MSCs se nalaze u mnogim adultnim tkivima (masnom tkivu, dermisu, periostu), u perifernoj krvi, menstrualnoj krvi, sinovijalnoj tekućini te u organima (jetra, slezena, pluća) (Da Silva Meirelles i sur., 2006., Kassis i sur., 2006., Zou i sur., 2010., Baer i Geiger 2012.) i predstavljaju atraktivnu kategoriju za regenerativnu medicinu i staničnu terapiju (Mimeault i Batra, 2008., Strauer i sur., 2009., Martinello i sur., 2011.).

MSCs posjeduju snažan potencijal samoobnavljanja, pokazuju stalan rast i sposobne su se *in vitro* diferencirati u brojne specijalizirane stanične tipove (Zuk i sur., 2002., Yamamoto i sur., 2007., Marinello i sur., 2011.). Međunarodno društvo za staničnu terapiju (*International Society for Cell Therapy* – ISCT) odredilo je kriterije za definiranje matičnih stanica. Prvi se odnosi na sposobnost prijanjanja matičnih stanica na dno plastične boce tijekom kultivacije. Drugi kriterij je sposobnost diferencijacije *in vitro* u osteoblaste, adipocite i/ili hondroblaste. Završno, stanice moraju ekspimirati površinske biljege CD73, CD90 i CD105 i ne smiju ekspimirati (>95% stanica u kulturi) površinske biljege CD14 ili CD11b, CD34, CD45, CD19 ili CD79 alfa (Dominici i sur., 2006., Marx i sur., 2015.).

## Matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva

Godine 2001. izdvojene su i opisane MSCs iz masnog tkiva (Zuk i sur., 2001.). Matične stanice podrijetlom iz masnoga tkiva osobito su zanimljive u okviru razvoja liječenja matičnim stanicama, ponajprije zbog jednostavnog uzorkovanja masnog tkiva i minimalne invazivnosti samoga zahvata (Bakker i sur., 2010.). Masno tkivo, kao izvor mezenhimskih matičnih stanica, posjeduje izvjesne prednosti u odnosu na druga tkiva, zato što je broj izoliranih matičnih stanica velik i stoga što je

dovoljan maleni uzorak tkiva za njihovu izolaciju (Kern i sur., 2006.). Visceralno masno tkivo kod pasa je relativno jednostavno uzorkovati u okviru vrlo čestog zahvata ovariohisterektomije u kuja (Martinello i sur., 2011.). Uzorak masti za izdvajanje matičnih stanica može biti podrijetlom i iz potkožja. U humanoj medicini najčešće se koristi lipoaspirat dobiven liposukcijom, zahvatom kojega pacijenti dobro podnose. Za izolaciju matičnih stanica ova metoda je jeftinija i manje invazivna u odnosu na aspiraciju koštane srži. U konačnici, lipoaspirat kao proizvod liposukcije na kraju se baca kao medicinski otpad, a u stvari predstavlja odličan izvor (autolognih) mezenhimskih matičnih stanica (Stafford i sur., 2002., Tholpady i sur., 2003., Peptan i sur., 2006., Vidal i sur., 2007., Neupane i sur., 2008., Baer i Geiger, 2012.).

## Terapijski potencijal matičnih stanica iz masnog tkiva

Mezenhimske matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva (ASCs) koriste se eksperimentalno u kliničkim studijama za nehematološka bolesna stanja u humanoj i veterinarskoj medicini.

Dva su osnovna pristupa:

1. Korištenje stromalne vaskularne frakcije (SVF)
2. Korištenje MSCs nakon umnažanja u kulturi stanica.

*Stromalna vaskularna frakcija (SVF)* dobije se podvrgavanjem masnog tkiva enzimskoj razgradnji kolagenazom pri čemu se oslobađaju pojedinačne stanice nazočne u masnom tkivu. Centrifugiranjem se odvajaju zreli adipociti i pelet s preostalim stanicama koje nazivamo SVF. Stanice SVF-e se izbroje i resuspendiraju u mediju ili fosfatnom puferu i administriraju

pacijentu u prethodno određenom broju i volumenu (Marx i sur., 2015.).

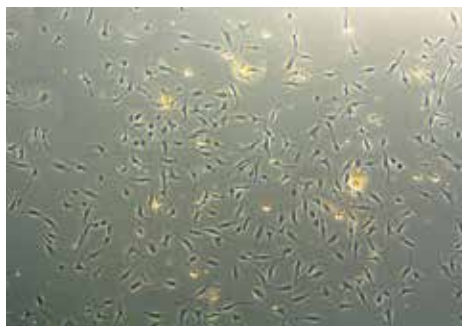
*Umnažanje u kulturi* podrazumijeva uzgajanje nasadenih stanica SVF-e u bočicama za staničnu kulturu na 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Neadherentne stanice se uklone izmjenom hranjivog medija nakon 48h. Stanice koje su adherirale na podlogu nastavljaju se umnažati uz mijenjanje hranjivog medija svaka 3-4 dana. Na ovaj način dobije se pročišćena populacija MSCs koje se dalje mogu umnažati, smrzzavati, imunofenotipizirati

te analizirati. Za terapijske svrhe nije poželjna dugotrajna kultivacija ovih stanica.

Istraživanja primjene matičnih stanica u kućnih ljubimaca se još uvijek provode (Martinello i sur., 2011.). Učestali poremećaji mišićno-koštanog sustava s oštećenjima zglobne hrskavice kod pasa, a za koja postojeće terapijske strategije imaju vrlo mali učinak, ubrzalo je izdvajanje i uporabu psećih MSCs (Bakker i sur., 2013.). Istraživanja primjene MSCs provedena su u pasa s degenerativnim



**Slika 1.** Umnažanje matičnih stanica u kulturi. Bočice za staničnu kulturu koje sadržavaju stromalnu vaskularnu frakciju u hranjivom mediju. Izvor: Arhiva Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju.



**Slika 3.** Mezenhimske matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva jednogodišnjeg psa. Nakon 72h od izdvajanja iz masnog tkiva stanice u kulturi su poprimile karakterističan vretenasti izgled i počinju se intenzivnije dijeliti. Izvor: Arhiva Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju.



**Slika 2.** Mezenhimske matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva jednogodišnjeg psa. Nakon 48h od izdvajanja iz masnog tkiva stanice u kulturi počinju poprimati karakterističan vretenasti izgled. Izvor: Arhiva Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju.



**Slika 4.** Mezenhimske matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva jednogodišnjeg psa. Nakon 96h od izdvajanja iz masnog tkiva stanice u kulturi popunjavaju površinu rasta i uskoro će biti spremne za pasažu. Izvor: Arhiva Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju.

oštećenjima intervertebralnog diska, pasa s ozljedama kralježničke moždine. Proučava se sposobnost regeneracije mišićnog tkiva, osobito kardiomiocita, liječenje stanja kakvo je osteoartritis (Bakker i sur., 2013.).

## Odgovor organizma na terapiju stanicama

Odgovor koji će pružiti organizam na transplantirane matične stanice iznimno je bitan i o njemu ovisi ishod same terapije. Nekoliko je čimbenika koji utječu na ishod terapije matičnim stanicama:

1. Imunološki odgovor domaćina na implantirane stanice
2. Mehanizmi navođenja stanice na mjesto ozljede
3. Diferencijacija implantiranih stanica pod utjecajem lokalnih signala (Barry i Murphy, 2004.).

## Imunološki odgovor domaćina

Imunološki odgovor domaćina nakon transplantacije MSCs predmet je brojnih istraživanja. MSCs imaju sposobnost imunomodulatornog djelovanja sprječavanjem proliferacije aktiviranih T stanica, *in vitro* i *in vivo*. Poznato je da su MSCs slabo imunogene, da djeluju imunosupresivno prema B limfocita, NK stanica, dendritičkih stanica, neutrofila na različite načine (Wada i sur., 2000.). Intravenoznom administracijom alogeneičkih MSCs kod životinjskih modela uočena je znatna supresija imunoloških reakcija primatelja nakon transplantacije, kod autoimunih bolesti kao i bolesti kod kojih je u osnovi upala (Wada i sur., 2000.). Slaba imunogenost matičnih stanica pripisuje se vrlo niskoj ekspresiji MHC I, nedostatku kostimulirajućih CD80, CD86 i CD40 (Herrero i Pérez-Simón, 2010.), nedostatku MHC II i izlučivanju cijelog spektra biomolekula i faktora rasta kroz

koje ostvaruju svoje djelovanje (Marx i sur., 2015.).

## Mehanizmi navođenja

MSCs imaju izvanrednu sposobnost migracije na mjesto ozljede nakon intravenozne primjene što je potvrđeno studijama u slučajevima frakture, infarkta miokarda (Shake i sur., 2002., Barry i Murphy, 2004.), ishemične ozljede mozga (Wang i sur., 2002., Barry i Murphy, 2004.). Intraartikularna primjena nakon traumatske ozljede koljena rezultirala reparacijom oštećene hrskavice i meniska (Murphy i sur., 2003.). Mehanizmi kojim se MSCs navode na mjesto ozljede još uvijek se istražuju, a uočeno je da se ta izvanredna osobina MSCs dugotrajnom kultivacijom u kulturi stanica smanjuje.

## Diferencijacija implantiranih stanica

Smatralo se da osnovni princip terapije matičnim stanicama počiva na činjenici da nediferencirane matične stanice nakon aplikacije odlaze na mjesto ozljede, prolaze kroz proces diferencijacije koji je pod utjecajem lokalnih signala te potom doprinose oporavku ozlijeđenog tkiva (Barry i Murphy, 2004.). Danas se smatra da svoj povoljni učinak stanice ostvaruju izlučivanjem različitih biomolekula kojima ostvaruju svoje djelovanje.

## Matične stanice na Hrvatskom veterinarskom institutu

Dugogodišnje iskustvo u radu s linijskim i primarnim kulturama stanica, koje su se koristile za potrebe znanstveno-istraživačkog i dijagnostičkog rada, olakšalo je i na određeni način postavilo dobre temelje pokretanju i razvoju rada s matičnim stanicama u Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju. Izdvojene se



**Slika 5.** Diferencijacija matičnih stanica u hondrocite u jažicama mikrotitracijske ploče. Vidljivo je formiranje sferoida obojanog alcian blue otopinom u jažicama koje su sadržavale diferencijacijski medij (jažice desno). Izostanak formiranja sferoida u jažicama koje su sadržavale medij za kultivaciju (negativna kontrola) i izostanak obojenja u plavo alcian blue otopinom (jažice desno). Izvor: Arhiva Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju.

matične stanice iz masnog tkiva pasa i mačaka koriste za potrebe znanstveno-istraživačkog rada, provodi se njihova ekspanzija, pohrana, identifikacija protočnom citometrijom obilježavanjem razlikovnih biljega specifičnim protutjelima, testovi diferencijacije, molekularne metode za analizu utjecaja *in vitro* kultivacije na ekspresiju gena psećih matičnih stanica (Krešić i sur., 2017.).

Budući da se regenerativna veterinarska medicina veoma brzo razvija, a matične stanice predstavljaju vrlo atraktivnu kategoriju zahvaljujući svojim osobinama, nametnule su se kao logičan korak u daljnjem razvoju i djelovanju Laboratorija.

## Literatura

1. BAER, P. C. and H. GEIGER (2012): Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 812693.
2. DA SILVA MEIRELLES, L., P. C. CHAGASTELLES and N. B. NARDI (2006): Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204-2213.
3. DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH, F. MARINI, D. KRAUSE, R. DEANS, A. KEATING, D. J. PROCKOP and E. HORWITZ (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for

Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

4. FRIEDENSTEIN, A. J., I. I. PIATETZKY-SHAPIRO and K. V. PETRAKOVA (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Experim. Morphol.* 16, 381-390.
5. FRIEDENSTEIN, A. J., K. V. PETRAKOVA, A. I. KUROLESOVA and G. P. FROLOVA (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247.
6. HERRERO, C. and J. A. PÉREZ-SIMÓN (2010): Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 425-430.
7. KASSIS, I., L. ZANGI, R. RIVKIN, L. LEVDANSKY, S. SAMUEL, G. MARX and R. GORODETSKY (2006): Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation* 37, 967-976.
8. KERN, S., H. EICHLER, J. STOEVE, H. KLÜTER and K. BIEBACK (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
9. KREŠIĆ, N., I. ŠIMIĆ, I. LOJKIĆ and T. BEDEKOVIĆ (2017): Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Transcriptome Composition Alterations: A Step towards Standardizing Therapeutic. *Stem Cells Int.* 2017: 4176292. <https://doi.org/10.1155/2017/4176292>.
10. MARTINELLO, T., I. BRONZINI, L. MACCATROZZO, A. MOLLO, M. SAMPAOLESI, F. MASCARELLO, M. DECAMINADA and M. PATRUNO (2011): Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res. Vet. Sci.* 91, 18-24.
11. MARX, C., M. D. SILVEIRA and N. B. NARDI (2015): Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. *Stem Cells Dev.* 24, 803-813. doi: 10.1089/scd.2014.0407
12. MIMEAULT, M. and S. K. BATRA (2008): Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implication. *Stem Cell Rev.* 4, 27-49.
13. NEUPANE, M., C. C. CHANG, M. KIUPEL and V. YUZBASİYAN-GURKAN (2008): Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. - Part A.* 14, 1007-1015.
14. PEPTAN, I. A., L. HONG and J. J. MAO (2006): Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 1462-1470.
15. SAFFORD, K. M., K. C. HICCK, S. D. SAFFORD, Y. D. HALVORSEN, W. O. WILKISON, J. M. GIMBLE and H. E. RICE (2002): Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 371-379.

16. STRAUER, B. E., C. M. SCHANNWELL and M. BREHM (2009): Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Min. Cardioangio* 57, 249-267.
17. THOLPADY, S. S., A. J. KATZ and R. C. OGLE (2003): Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat. Rec.-Part A*, 272, 398-402.
18. VIDAL, M. A., G. E. KILROY, M. J. LOPEZ, J. R. JOHNSON, R. M. MOORE and J. M. GIMBLE (2007): Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.* 36, 613-622.
19. WADA, N., S. GRONTHOS and P. M. BARTOLD (2013): Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol.* 63, 198-216. doi: 10.1111/prd.12024.
20. YAMAMOTO, N., H. AKAMATSU, S. HESEGAWA, T. YAMADA, S. NAKATA, M. OHKUMA, E. MIYACHI, T. MARUNOUCHI and K. MATSUNAGA (2007): Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J. Dermat. Sci.* 48, 43-52.
21. ZOU, Z., Y. ZHANG, L. HAO, WANG F, D. LIU, Y. SU and H. SUN (2010): More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 10, 215-230.
22. ZUK, P. A., M. ZHU, H. MIZUNO, J. HUANG, J. W. FUTRELL, A. J. KATZ, P. BENHAIM, H. P. LORENZ and M. H. HEDRICK (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228.
23. ZUK, P. A., M. ZHU, P. ASHJIAN, D. A. DE UGARTE, J. I. HUANG, H. MIZUNO, Z. C. ALFONSO, J. K. FRASER, P. BENHAIM and M. H. HEDRICK (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279-4295.

## Mesenchymal stem cells in veterinary medicine

Nina KREŠIĆ, DVM, Assistant, Ivana LOJKIĆ, BSc, Scientific Advisor, Ivana ŠIMIĆ, DVM, Assistant, Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Regenerative veterinary medicine exploits the ability of adult stem cells and the organism to regenerate damaged cells, tissues and organs, requires a reliable source of stem cells. Adipose tissue is a rich, accessible and abundant source of adult stem cells, providing many opportunities for applications in regenerative veterinary medicine. Adipose derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) adhere to plastic,

differentiate into different cell lines (adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, myocytes, neuronal cells), and are characterized by the expression of specific cell surface markers. AD-MSCs continue to raise interest within the scientific and clinical community.

**Key words:** stem cells; adipose tissue, therapeutic potential; veterinary medicine